

**Einfluss von antimikrobiell wirksamen Substanzen auf die  
Freisetzung von Matrixmetallproteinasen aus Fibroblasten  
nach Kontakt mit parodontopathogenen Keimen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae

(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Bettina Brungsberg

geboren am 30.11.1980 in Essen

### **Gutachter**

1. PD Dr. Eick
2. Prof. Dr. Glockmann
3. Prof. Dr. Jentsch

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.05.2009**

## **Abkürzungsverzeichnis**

A.a./ A. actinomycetemcomitans

Aqua dest.

AP

APS

DDT

DMEM

EGF

EDTA

ELISA

FKS

HGF

IL

KBE

LPS

MHK

MMP

OD

PBS

P. g./ P. gingivalis

PGE

PMN

TBS

Temed

TGF

TIMP

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Bidestilliertes Wasser

Aktivator Protein

Ammoniumpersulfat

Dichlorodiphenyltrichloroethan

Dulbeccos Modified Eagles Medium

Epidermal growth factor

Ethylendiamintetraessigsäure

Enzyme Linked Immunosorbent Assay

fetales Kälberserum

Human Gingival Fibroblast

Interleukin

Kolonie bildende Einheit

Lipopolysaccharid

minimale Hemmkonzentration

Matrixmetallproteinasen

optische Dichte

Phosphate buffered saline

Porphyromonas gingivalis

Prostaglandin E

Polymorphkernige Granulozyten

Tris buffered saline

Tetramethylethylendiamid

Transforming growth factor

Tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase

TNF

Tumornekrosefaktor

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Definition der Parodontopathien	3
2.2	Klassifikation der Parodontopathien	3
2.3	Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	5
2.4	Bedeutung und Charakteristik von Aggregatibakter actinomycetem-comitans und Porphyromonas gingivalis bei der Manifestation und Progredienz der Parodontitis	5
2.5	Rolle der Matrixmetallproteinasen bei parodontalen Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung von MMP-3	9
2.6	Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen	12
2.7	Antibiotika als Therapeutika in der Parodontitisbehandlung	13
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
4.1.	Die Zellen und deren Passage	17
4.2.	Bakterienstämme	18
4.3.	Antibiotika	19
4.4.	Versuchsansatz I: Untersuchung der konzentrationsabhängigen antibakteriellen Wirkung	20
4.5.	Versuchsansatz II: Nachweis von MMP-3 aus den Überständen mittels ELISA	23
4.6.	Versuchsansatz III: Kontrolle des Abbaus von MMP-3 durch P. gingivalis mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
5.1	Wirkung der Antibiotika auf die untersuchten Bakterienstämme	28
5.1.1	Tetrazyklin	29
5.1.2	Minocyclin	29
5.1.3	Doxycyclin	30

5.1.4	Metronidazol	32
5.1.5	Moxifloxacin	33
5.2	Freisetzung von MMP-3 aus Fibroblasten	34
5.2.1	Einfluss der Bakterien	34
5.2.2	Wirkung von Tetrazyklin	34
5.2.3	Wirkung von Minocyclin	35
5.2.4	Wirkung von Doxycyclin	36
5.2.5	Wirkung von Metronidazol	38
5.2.6	Wirkung von Moxifloxacin	39
5.3	Abbau von MMP-3 durch Porphyromonas gingivalis	40
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
6.1	Methodik	41
6.2	Wirkung von Antibiotika auf die Bakterienstämme	44
6.3	Freisetzung von MMP-3	48
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>55</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>68</b>
<b>A</b>	<b>Danksagung</b>	<b>73</b>
<b>B</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>74</b>
<b>C</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>75</b>

# 1 Zusammenfassung

*Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* spielen in der Progression parodontaler Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Durch Pathogenitätsfaktoren beeinflussen sie Gewebezellen wie Fibroblasten, wirken modulierend auf die Immunantwort und können zu einer vermehrten Freisetzung und Aktivierung von Matrixmetallproteinase führen. Zur Behandlung parodontaler Erkrankungen werden Antibiotika häufig als adjuvante Therapeutika eingesetzt. Wo früher allein der antibakterielle Effekt im Vordergrund stand, werden heute enzymmodulierende Eigenschaften, z.B. auf MMPs, stärker diskutiert.

Ziel der vorliegenden In vitro Arbeit war es zum einen, den Einfluss der verschiedenen Antibiotika Tetrazyklin, Minocyclin, Doxycyclin, Moxifloxacin und Metronidazol auf die Anzahl der Bakterien als auch auf die Freisetzung von MMP-3 aus gingivalen Fibroblasten zu untersuchen, zum anderen sollte die Frage nach einem möglichen Abbau von MMP-3 durch *P. gingivalis* beantwortet werden.

Zunächst wurden die Fibroblasten mit den parodontopathogenen Keimen infiziert und anschließend mit jeweils drei verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Antibiotika ( $\frac{1}{4}$  MHK als subinhibitorischen Konzentration, die Konzentration entsprechend dem Level bei systemischer Applikation sowie 100 µg/ml als möglicher Konzentration bei lokaler Applikation des Antibiotikums) inkubiert. Als Bakterienstämme wurden *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 sowie *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M51-2 verwendet. Die Versuchsdauer betrug eine, sechs und 18 Stunden. Ebenso wurde zu diesen Zeitpunkten Zellkulturüberstand entnommen, der nachfolgend mittels ELISA-Tests auf die aus den Fibroblasten freigesetzte Menge an MMP-3 analysiert wurde. Die Untersuchung auf Spaltung von MMP-3 erfolgte durch Protein-Gelelektrophorese.

Die Tetrazyklinpräparate wiesen bei einer Antibiotikakonzentration von 100 µg/ml und einer Einwirkzeit von 18 Stunden eine hohe Effektivität auf, wobei es allerdings nie zu einer vollständigen Eliminierung kam. Allein Moxifloxacin führte bei 100 µg/ml nach 18 Stunden bei beiden *A. actinomycetemcomitans* Stämmen und bei *P. gingivalis* ATCC 33277 zu einer Abtötung aller Keime. Auch die kürzere Einwirkzeit von 6 Stunden erzielte bei

*A. actinomycetemcomitans* eine deutliche Reduzierung. Inkubation mit Metronidazol hatte selbst bei Konzentrationen von 100 µg/ml keinen nennenswerten Effekt auf die Bakterien.

Fibroblasten setzen schon im Ruhezustand kontinuierlich MMP-3 frei. Antibiotika modulieren die Freisetzung von MMP-3. Nach einer Einwirkzeit von 18 Stunden wurde nach Zugabe von Tetrazyklin, Doxycyclin, Minocyclin und Metronidazol konzentrationsabhängig weniger, nach Zugabe von Moxifloxacin mehr MMP-3 gemessen. Die Infektion der Fibroblasten mit *A. actinomycetemcomitans* erzeugte einen deutlichen Anstieg der MMP-3-Sezernierung. Minocyclin, Doxycyclin und Moxifloxacin konnten stammspezifisch die Menge der detektierbaren Proteasen senken. Eine hemmende Wirkung auf die *A. actinomycetemcomitans* assoziierten LPS ist zu vermuten. Tetrazyklin führte bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu einer ansteigenden Menge an MMP-3, die Anwesenheit von Metronidazol hatte keinen Effekt auf die bakterienassoziierte MMP-3-Freisetzung. Nach Infektion mit *P. gingivalis* verringerte sich der Spiegel an MMP-3. Dieser stieg nur in geringem Ausmaß nach Zugabe von Minocyclin. *P. gingivalis* ist in der Lage, MMP-3 zu spalten.

Tetrazyklin, Doxycyclin, Minocyclin und Moxifloxacin wiesen in hohen Dosen eine keimreduzierende Wirkung im Zusammenhang mit Gingivafibroblasten auf. Allerdings erzielte nur Moxifloxacin die erwünschte Bakterieneliminierung. Die untersuchten Antibiotika modulieren die Freisetzung von MMP-3 aus humanen gingivalen Fibroblasten und wirken auf die Pathogenitätsfaktoren der Mikroorganismen. Minocyclin, Doxycyclin und Moxifloxacin wirken hemmend auf die *A. actinomycetemcomitans* assoziierte MMP-3 Sezernierung und scheinen damit in der Therapie aggressiver Parodontitiden vorteilhafte Antibiotika zu sein. Aufgrund der mangelnden Wirksamkeit von Tetrazyklin und Metronidazol auf die bakterienbedingte Enzymfreisetzung sollte eine Behandlung mit diesen kritisch bewertet werden. Hohe Werte an MMP-3 können zu einer Progredienz der Erkrankung führen.



## **2 Einleitung**

### **2.1 Definition der Parodontopathien**

Parodontitis ist eine entzündliche, durch bakterielle Beläge verursachte Erkrankung aller Anteile des Parodontiums (Drisco 2001), das heißt, der Gingiva, des Desmodonts, des Wurzelzements und des Alveolarknochens mit fortschreitendem Verlust von Stützgewebe. Die Erkrankung kann sich an einzelnen, mehreren oder allen Zähnen abspielen. Phasen der Aktivität mit Exazerbation der Entzündung und knöcherner Resorption wechseln sich mit Phasen der Inaktivität ab, in denen sich resorptive und regenerative Prozesse die Waage halten. Der Schweregrad und Verlauf kann durch verschiedene anatomische, funktionelle und systemische Faktoren beeinflusst werden (Tonetti 1994; Heidemann 2005).

### **2.2 Klassifikation der Parodontopathien**

1999 wurde auf dem internationalen Workshop für Clinical Periodontics in Illinois, USA eine neue Klassifikation für parodontale Erkrankungen verabschiedet (Armitage 1999). Diese beinhaltet folgende Einteilung:

1. Gingivitiden
  - Plaque induziert
  - nicht Plaque induziert
2. Chronische Parodontitis
  - lokalisiert
  - generalisiert
3. Aggressive Parodontitis
  - lokalisiert
  - generalisiert
4. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
  - hämatologische Erkrankung
  - genetische Erkrankung
5. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen

- nekrotisierende ulzerierende Gingivitis
- nekrotisierende ulzerierende Parodontitis

#### 6. Parodontaler Abszess

#### 7. Parodontal-Endodontale Läsion

#### 8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände

In dieser Nomenklatur wird anstelle des ehemaligen Begriffs der „adulten Parodontitis“, die Bezeichnung der „chronischen Parodontitis“ (CP) verwendet. Ebenso wurde der Begriff der „rasch progressiven Parodontitis“ durch „Aggressive Parodontitis“ (AP) und „lokalisierte juvenile Parodontitis“ durch „lokalisierte aggressive Parodontitis“ (LAP) ersetzt. Die Einteilung in generalisiert und lokalisiert bezieht sich auf die Anzahl der Messpunkte an denen ein Attachment- und Knochenverlust vorzufinden ist. Die chronische Erkrankung ist plaqueinduziert, wobei das Ausmaß der parodontalen Destruktion mit der Menge lokaler ätiologischer Faktoren, z.B. der Konkrementmenge, korreliert. Sie kommt am häufigsten vor und meist sind ältere Menschen betroffen. Die aggressive Parodontitis ist durch eine rasche Progression mit hochgradigem Attachmentverlust und massivem Knochenabbau, welcher nicht in Korrelation mit dem Mundhygieneverhalten des Patienten steht, gekennzeichnet. Sie betrifft vor allem Patienten im jugendlichen Alter und führt zu einer Destruktion des parodontalen Gewebes im Bereich der Inzisivi und der ersten Molaren. (Hellwig 1999). Die Patienten sind ansonsten klinisch gesund. Allerdings tritt eine familiäre Häufung dieses Krankheitsbildes auf (Armitage 1999). Das Problem dieser Klassifikation ist, dass sie hauptsächlich auf dem Denkmuster der Infektion–Wirtsantwort beruht und es durch die Vielfalt der Unterteilungen in verschiedene Gruppen zu multiplen Interpretationsmöglichkeiten kommt. Trotz des großen Wissenszuwachses über parodontale Erkrankungen weiß man heute immer noch zu wenig, um auf ätiologischer Basis eine Diagnose und Klassifikation der Krankheit zu erstellen (Van der Velden 2005). Aus klinischen und wissenschaftlichen Gesichtspunkten wird daher vorgeschlagen, die Parodontitis als ein Syndrom anzusehen, welches mit parodontaler Zerstörung einhergeht und durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird (Baelum und Lopez 2003).

## **2.3 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis**

Es ist bewiesen, dass bakterielle Plaque parodontale Erkrankungen auslöst, wobei vor allem die Reaktion des Wirtsorganismus auf bestimmte Mikroorganismen für die Gewebedestruktion verantwortlich ist. Neben *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* (früher *Bacteroides forsythus*), *Streptococcus intermedius* und *Porphyromonas micros* spielen besonders *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ehemals *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (Norskov-Lauritsen und Kilian 2006)) eine entscheidende Rolle bei parodontalen Erkrankungen (Drisko 2001). Die Bakterien oder deren Stoffwechselprodukte stimulieren indirekt die Entzündung, indem sie zu einer exzessiven Produktion von Prostaglandinen und Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 führen (Graves et al. 2004). Diese Mediatoren induzieren die Produktion und Aktivierung von gewebszerstörenden Enzymen, wie den Matrixmetalloproteinasen (Beklen et al. 2006). Es kommt zur vermehrten Stimulation von Osteoklasten und zum Abbau des alveolären Knochens. Als bedeutendste Risikofaktoren gelten systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus (Graves et al. 2004), Nikotinkonsum (Tonetti 1998), Umweltfaktoren wie Stress und soziales Umfeld (Wakai et al. 1999), lokale Faktoren wie Zahnstellung (Heidemann 2005) und genetische Faktoren wie z.B. eine reduzierte IgG<sub>2</sub>-Produktion (Page 1999) oder Funktionsveränderungen von TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  (Meyer und Fives-Taylor 1997).

## **2.4 Bedeutung und Charakteristik von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* bei der Manifestation und Progredienz der Parodontitis**

In der Mundhöhle eines bezahnten Menschen sind mehr als 400 Bakterienarten vorzufinden (Moore und Moore 1994), wovon die meisten aber keine pathogenen Veränderungen am Wirt auslösen. Die Entstehung und Progression entzündlicher Parodontalerkrankungen ist hauptsächlich durch die Anwesenheit parodontopathogener, vor allem gramnegativer Bakterien bedingt, die sich in der subgingivalen Plaque befinden. Dazu gehören insbesondere *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* (Genco et al. 1996, Meyer und Fives-Taylor 1997), auf deren Eigenschaften im Folgenden näher eingegangen werden soll.

## **Aggregatibacter actinomycetemcomitans**

2006 wurde das ehemals als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* benannte Bakterium mit *Haemophilus aphrophilus* und *Haemophilus segnis* zu einer neuen Gattung *Aggregatibacter* gen. nov. zusammengefasst und trägt seitdem die Bezeichnung *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen und Kilian 2006). Diese Art der Gattung *Aggregatibacter* ist unabhängig vom Faktor X und besitzt eine variable Faktor V-Abhängigkeit für das Wachstum In vitro.

*A. actinomycetemcomitans* ist ein kleines, nicht bewegliches, gramnegatives, mikroaerophiles, saccharolytisches Stäbchen, das in der Kultur Kolonien mit einem typischen Sternmuster ausbildet. Es existieren sechs unterschiedliche Serotypen (a-f). Ein bestimmter Klon des Serotyps b verfügt über ein besonders potentes Leukotoxin und wird vor allem bei aggressiver Parodontitis gefunden, während Serotyp a häufiger bei chronischer Parodontitis und Serotyp c vorwiegend bei parodontal Gesunden zu finden ist (Haffajee und Socranski 1994). Im Allgemeinen aber stellt *A. actinomycetemcomitans* den Leitkeim der lokalisierten aggressiven Parodontitis dar (Slot und Ting 1999), wobei die Übertragung zwischen Eltern und Kindern und zwischen Geschlechtspartnern erfolgen kann (Petit et al. 1993, Preus et al. 1994). Die Elimination des Keims aus der parodontalen Tasche ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie der Patienten mit dieser Parodontitisform (Zambon 1985). Das Bakterium wird außerdem mit der entzündlichen Endokarditis und anderen systemischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (van Winkelhoff und Slots 1999).

Die mutmaßlichen Virulenzfaktoren können unterteilt werden in entzündungsmodulierend wirkende, Gewebeerstörung induzierende und Gewebeaufbau verhindernde Faktoren, wobei diese einander überlappen können (Henderson et al. 2002).

Als ein Virulenzfaktor von *A. actinomycetemcomitans* spielt vor allem das Leukotoxin eine entscheidende Rolle in der Progredienz der Parodontitis. Es ist ein 116 kDa schweres Protein aus der Familie der RXT (repeats in toxin)-Toxine. Es bewirkt eine zellspezifische Veränderung der Zellwandpermeabilität, welches zur osmotischen Lyse von Fresszellen, wie Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, führt (Sanderink und Bengel 1995, Guthmiller et al. 2001).

Als weiterer Pathogenitäts- und Virulenzfaktor zählt unter anderem die Invasionsfähigkeit in Epithelzellen, wobei ein transferrinrezeptorvermittelter Zelleintritt diskutiert wird (Meyer und Fives-Taylor 1997). Nach Kontakt der Mikrovilli der Wirtszelle mit dem Bakterium kommt es zum Eintritt in die Zelle mit darauffolgender rascher Vermehrung im Zytoplasma. Die Mikroorganismen können durch Zelllyse direkt wieder austreten oder sich innerhalb der Zellen vermehren. Bei diesem zweiten Prozess haben die Bakterien keinen Kontakt zum Extrazellularraum und umgehen somit die Wirtsabwehr. Eine exzessive Immunantwort wird induziert welche zum klinischen Bild der aggressiven Parodontitis führt (Meyer et al. 1996, Lamont und Yilmaz 2002).

Die von *A. actinomycetemcomitans* gebildeten LPS sind an der Resorption des alveolären Knochens beteiligt. Sie stimulieren die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  aus Makrophagen und Leukozyten (Nishida E et al. 2001, Yoshimura et al. 1997). Des Weiteren führen sie zur Freisetzung von verschiedenen Matrixmetallproteinasen aus gingivalen Fibroblasten (Bodet et al. 2007). Lipopolysaccharide verursachen neben der Knochenresorption und Aktivierung von Makrophagen auch Hautnekrosen und führen zur Plättchenaggregation (Kiley und Holt 1980).

Die Fähigkeit zur Adhäsion untereinander, an Kollagen, Fibronectin und Epithelzellen durch Exprimierung von in Bündeln angeordneten Fimbrien spielt eine wichtige Rolle bei der Progredienz der Parodontitis (Meyer und Fives-Taylor 1997, Henderson et al. 2002).

Weitere durch *A. actinomycetemcomitans* exprimierte, an der Gewebeerstörung beteiligte Faktoren sind die Exotoxine. Zu ihnen zählen Kollagenasen, saure und alkalische Phosphatasen, Fibroblastentoxine, epitheliale Toxine (Zambon 1985), und als weitere Faktoren Hämolyisin, immunsuppressive Faktor, Fibrinolyisin und die Plasmakoagulase (Köhler 1994).

### **Porphyromonas gingivalis**

*P. gingivalis* ist ein gramnegatives, nicht bewegliches, asaccharolytisches Stäbchen, das auf Blutagar braune bis schwarze Kolonien ausbildet (Heidemann Hrsg. 2005). Es ist meist zusammen mit *T. forsythia* und *Treponema denticola* im so genannten „roten Komplex“ zu finden (Stanley et al. 2005). Der Keim ist vor allem in der dentalen Plaque, in tiefen parodontalen Taschen aber auch auf der bukkalen Schleimhaut, dem Zungenrücken und den Tonsillen vorzufinden (Cutler et al. 1995). Er gehört zu den späten oder sekundären

Besiedlern der Mundhöhle und benötigt vorhergehende Mikroorganismen, um die für ihn erforderlichen anaeroben, substratreichen Bedingungen mit Bindungsstellen zur Koaggregation zu schaffen (Theilade 1990). Die Übertragung kann, wie bei *A. actinomycetemcomitans*, zwischen Eltern und Kindern und zwischen Geschlechtspartnern (Van Steenberg et al. 1993) durch Speichel erfolgen (Greenstein und Lamster 1997). *P. gingivalis* ist einer der am häufigsten mit schweren Formen der Parodontitis, in besonderem Maße chronischen Parodontitiden assoziierten Mikroorganismen (Genco et al. 1996, Klein und Goncalves 2003), kann gelegentlich aber auch in entzündungsfreiem, gesunden parodontalem Gewebe zu finden sein (Liu et al. 2003).

Es besitzt ein großes Repertoire an Virulenzfaktoren, welche die Kolonisation am Parodont ermöglichen und den Knochen und Zahnhalteapparat zerstören können. Die Expression dieser Faktoren differieren in den verschiedenen Stämmen (Eick et al. 2002). Die meisten Stämme von *P. gingivalis* exprimieren Fimbrien, welche in der Regel peritrich angeordnet sind. Sie sind zwischen 0,3 und 3,0 µm lang und haben einen Durchmesser von ca. 5 nm (Lamont und Jenkinson 1998). Durch die Fimbrien besitzt *P. gingivalis* die Fähigkeit, sich an prolinreiche Proteine des Speichels, andere Bakterien, Epithelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Bestandteile der extrazellulären Matrix zu binden (Amano 2003). Chemotaktische Fähigkeiten und Induktion von Zytokinen stehen ebenfalls im Zusammenhang mit diesen (Lamont und Jerkinson 1998). Auch bei der Invasion von *P. gingivalis* in gingivale Epithelzellen und Endothelzellen spielen Fimbrien eine entscheidende Rolle (Dorn et al. 2000). Mit deren Hilfe bindet *P. gingivalis* spezifisch an Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen und initiiert seine aktive Aufnahme in diese (Njoroge et al. 1997, Weinberg et al. 1997). Dort persistiert das Bakterium und kann sich vermehren (Madianos et al. 1996). Die internalisierten Mikroorganismen sind für Antibiotika nicht mehr zugänglich und können auch durch die Wirtsabwehr nicht eliminiert werden (Lantz 1996).

*P. gingivalis* produziert eine Reihe verschiedener proteolytisch wirkender Enzyme. Diese Proteasen dienen unter anderem der Aufspaltung von Proteinen zum Zweck der Nahrungsgewinnung. Sie werden als wichtige Virulenzfaktoren angesehen, da sie das Wachstum von *P. gingivalis* ermöglichen und zu einer Zerstörung des Wirtsgewebes führen (Potempa et al. 2000). Cysteinproteinasen, auch Gingipaine genannt, besitzen dabei mit 85% den größten Anteil der proteolytischen Aktivität (Potempa 1997). Sie können extrazelluläre Matrixbestandteile, z.B. Laminin, Fibrinogen und die Kollagentypen III, IV und V binden und

abbauen (Pike et al. 1996, Potempa 2000). Außerdem können sie die Ausschüttung und Aktivierung von Matrixmetallproteinasen beeinflussen (Zhou und Windsor 2007) und die Produktion proinflammatorischer Zytokine dysregulieren (Potempa et al. 2000).

Neben den proteolytischen Enzymen produziert *P. gingivalis* auch eine Reihe von hydrolytischen Enzymen. Zu den wichtigen Enzymen dieser Wirkungsweise zählen unter anderem die Hyaluronidase, Chondroitinase, Neuraminidase, Phospholipase, sowie eine saure und alkalische Phosphatase welche, wie die Gingipaine, zur Zerstörung des parodontalen Bindegewebes, Epithels und anderen Zellen führen (Eley und Cox 2003).

Die von *Porphyromonas* gebildeten LPS spielen ebenfalls eine große Rolle in der Pathogenese der Parodontitis. Zum einen besitzen sie eine stark antigene Wirkung und zum anderen kann nach Kontakt mit verschiedenen Zellen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren induziert werden. Aus Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten kann es zur Entlassung von Prostaglandin E<sub>2</sub>, und die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  kommen. LPS besitzen die Fähigkeit Osteoblasten zu aktivieren und die Produktion und Freisetzung von Matrixmetallproteinasen zu induzieren (Lamont und Jerkinson 1998, Holt 1991).

Die charakteristische schwarze Färbung der Kolonien von *P. gingivalis* kommt durch die Fähigkeit zur Verstoffwechselung von Hämoglobin und Häm zustande. Dadurch ist ein genügendes Angebot an dem für das Wachstum obligatorischen Nährstoff Eisen gewährleistet (Bramanti et al. 1993, Lamont und Jerkinson 1998, Genco 1995).

*P. gingivalis* kann, ebenso wie *A. actinomycetemcomitans*, in Epithelzellen eindringen und dort persistieren (Eick et al. 2006).

## **2.5 Die Rolle der Matrixmetallproteinasen bei parodontalen Erkrankungen**

Die Matrixmetallproteinasen (MMPs) sind eine Familie zinkabhängiger Endopeptidasen und bestehen aus mindestens 28 verschiedenen Gruppen, die sich wieder in Untergruppen einteilen lassen. Zu ihnen zählen z.B. Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Membrantyp-Matrixmetallproteinase und andere. Sie sind verantwortlich für die Aufspaltung extrazellulärer Matrixbestandteile wie Kollagen, Fibronectin und Laminin. MMPs werden

von verschiedenen Zellen produziert. Zu diesen Zellen gehören neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten. Matrixmetallproteinasen spielen sowohl bei physiologischen Vorgängen, wie der Zahneruption, als auch bei pathologischen Vorgängen, wie der Parodontitis, eine Rolle. Bei letzterer führen sie, gemeinsam mit anderen Proteinasen, z.B. der neutrophilen Elastase, zur Zerstörung des parodontalen Gewebes (Birkedal-Hansen 1993, Birkedal-Hansen et al. 1993). Das Ausmaß des Knochenverlustes steht dabei in Korrelation mit der Menge der im Serum befindlichen aktivierten Matrixmetallproteinasen (Ryan und Golub 2000). Die Enzyme werden außerdem mit Herz-Kreislauferkrankungen, Spätfolgen des Diabetes mellitus und Frühgeburten in Verbindung gebracht (Genco et al. 1999; Ryan 1998; Offenbacher et al. 1998). Des Weiteren sind sie an der kariösen Zerstörung von Zahnhartsubstanz und bei der Invasion oraler Tumore beteiligt (Sorsa et al. 2004).

Die Aktivität der Matrixmetallproteinasen wird unter anderem durch Veränderungen in der Balance zwischen der Expression und Synthese von MMPs und deren endogenen Hauptinhibitoren, den Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases reguliert. Die katalytische Kompetenz der MMPs wird durch die Aktivierung von Proenzymen und die Inhibierung der Aktivierung bzw. Aktivität der TIMPs kontrolliert (Uitto et al. 2003).

Die meisten dieser Enzyme werden in inaktiver Form sezerniert und können durch Spaltung einer Zn-Cystein-Bindung aktiviert werden. Es wird vermutet, dass die von parodontopathogenen Keimen exprimierte Proteinase dabei eine wichtige Rolle spielen. *P. gingivalis* kann MMP-1, MMP-3 und MMP-9 aktivieren und die Aktivität von MMP-1 durch MMP-3 hochregulieren (DeCarlo et al. 1997).

Die katalytischen Domänen der MMPs beherbergen im aktiven Zentrum ein Zink-Bindungsmotiv, in welchem die drei für die Bindung essentiellen Histidine, sowie einem für die Proteolyse wichtigen Glutaminsäurerest positioniert sind (Knauper et al. 1990). Neben dem für die Katalyse verantwortlichen Zink-Ion findet man ein weiteres strukturelles Zink-Ion (Wetmore 1996), sowie je nach MMP ein, zwei oder drei Calcium-Ionen, welche ebenfalls strukturstabilisierenden Charakter besitzen und für das proteolytische Potential der Enzyme essentiell sind (Housley et al. 1993, Uitto et al. 2003).

Der Nachweis von aktivierten MMPs oder deren Abbauprodukte wie Collagen Typ I Fragmente in der Sulcusflüssigkeit wird heute als Diagnostikmethode für die Vorhersage



zukünftigen Attachmentverlusts und die Reaktion auf Therapiemethoden verwendet (McCulloch 1994, Giannobile et al. 1995, Golub et al. 1997).

Es existieren unterschiedliche Ansatzmöglichkeiten, die knochenzerstörende Aktivität der MMPs zu inhibieren. Man kann Wirkstoffe einsetzen, welche die Synthese bzw. Freisetzung dieser Enzyme hemmen, die Katalysierung von proMMPs in die aktivierte Form verhindern, aktivierte Enzyme direkt hemmen, oder die Synthese und Freisetzung endogener Inhibitoren, wie den TIMPs fördern (Ryan et al. 1996).

Matrixmetallproteinasen können z.B. durch Tetrazykline, Glukokortikoide und kationischen Chelatoren wie Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) und Phenanthrolin gehemmt bzw. inaktiviert werden (Ryan et al. 2001, Saito et al. 1999).

### **MMP-3**

MMP-3, auch Stromelysin-1 genannt, ist eine Metallproteinase mit breiter Substratspezifität und kann Laminin, Proteoglykane, Fibronectin und Kollagen (Typ III, IV, V, IX) abbauen (Matrisian 1992, Parson et al. 1997).

Bei Patienten mit Parodontitis ist vor allem in der aktiven Phase ein erhöhter Serumspiegel dieses Enzyms in der Sulkusflüssigkeit vorzufinden (Ingman et al. 1996), wobei der Level mit den klinischen Parametern korreliert und mit der Progression der Erkrankung assoziiert wird (Alpagot et al. 2001).

Die Expression von MMP-3 wird, wie von anderen Matrixmetallproteinasen auch, durch bestimmte Zytokine beeinflusst. Besonders IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und EGF (epidermal growth factor) erhöhen dessen Produktion in gingivalen Fibroblasten, hingegen erniedrigen COX-2 Inhibitoren, MAP-Kinaseinhibitoren und Tyrosinkinaseinhibitoren diese (Domeij et al. 2002). TNF- $\alpha$  stimulierte Fibroblasten sezernieren ein latentes 55 kDa schweres proMMP-3, welches nach proteolytischer Spaltung in die aktive 40 bis 45 kDa schwere Form umgewandelt wird. Man geht davon aus, dass die von neutrophilen Granulozyten sezernierte Protease Cathepsin G und Elastase eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung spielen (Beklen et al. 2006).

Aktiviertes MMP-3 besitzt die Fähigkeit weitere Prokollagenasen wie proMMP-1 (Murphy G 1987), proMMP-8 und pro-Gelatinase B (MMP-9) zu aktivieren. Diese sind für den Abbau

von Typ I-Kollagen und Gelatine verantwortlich und vor allem in der aktiven Phase der Parodontitis vorzufinden (Beklen et al. 2006, Lee et al. 1995).

## **2.6 Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen**

Ziel der parodontalen Therapie ist es, die Entzündung als Auslöser der resorptiven Vorgänge zu eliminieren (Heidemann 2005). Als Zeichen einer erfolgreichen Therapie gilt das Fehlen von Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung, Schmerz oder Blutung bei Sondierung, sowie ein funktional gutes Attachmentlevel, geringe oder keine Rezessionen und fehlender interdentaler Knochenabbau (Academy Report 2001). Da die subgingivale Plaque als Hauptauslöser von Parodontitiden gilt, sollte der erste Schritt der Therapie in der quantitativen Reduktion oder möglichst Elimination dieser bestehen (Axelson et al. 1991).

Es existieren unterschiedliche Therapiekonzepte, die zur Realisierung dieses Zieles führen und häufig gemeinsam eingesetzt werden:

- konservative, nicht chirurgische Maßnahmen
- chirurgische Therapie
- lokale und systemische antimikrobielle Behandlung
- Motivation/Mundhygieneinstruktion

Die konservative, nicht chirurgische mechanische Therapie besteht in der Entfernung von Plaque, Zahnstein und anderen plaque-retentiven Faktoren mittels supra- und subgingivalem Scaling und Rootplaning (Drisko 2001). Sie kann durch lokale oder systemische Applikation von Antibiotika, z.B. Amoxicillin, Doxycyclin, Clindamycin oder Metronidazol, ergänzt werden, wobei jedoch zur Elimination der Infektion ein alleiniger Einsatz von Antibiotika nicht ausreicht und dieser nur als Zusatzmaßnahme zur mechanischen Taschentherapie dient (Plagmann 1998, Walker et al. 2004, Slots und Jorgenson 2002). Weitere antimikrobielle Stoffe, die in der Parodontistherapie eine Rolle spielen, sind Fluoride, Bisbiguanide, wie Chlorhexidin, Phenol-Derivate wie Triclosan und Pflanzenextrakte wie Sanguinarin (Marsh 1992, Drisko 2001).

## **2.7 Antibiotika als Therapeutika in der Parodontitisbehandlung**

Es gibt bestimmte Indikationen in der Parodontitistherapie, bei denen eine adjuvante Antibiotikagabe unterstützend erfolgen sollte. Dazu gehören schwere Verlaufsformen der aggressiven Parodontitis, therapieresistente chronische Parodontitiden, Parodontalabszesse mit Tendenz zur Ausbreitung in Logen und schwere Parodontitiden im Verlauf systemischer Erkrankungen oder Zuständen, die die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen. Chronische Gingivitiden und leichte Parodontitiden sind durch alleinige mechanische Therapiemaßnahmen beherrschbar und bedürfen keiner zusätzlichen Antibiotikaunterstützung (DGZMK 2003, Ciancio 2002, Slots und Jorgensen 2002, Slots und Rams 1990). Das Vorkommen parodontopathogener Bakterien ist bei Patienten mit Parodontitis individuell unterschiedlich und die Wirksamkeit von Antibiotika auf einige Bakteriengruppen eingeschränkt. Deshalb soll zur Auswahl eines geeigneten Antibiotikums die vorliegende parodontale Infektion durch eine mikrobiologische Analyse der subgingivalen Plaque bestimmt werden (Paster et al. 2001, Lopez-Piriz et al. 2007, Slots und Jorgensen 2002). Die Applikation kann lokal oder systemisch erfolgen.

Systemisch zu applizierende Antibiotika haben folgende Eigenschaften für ihren effektiven Einsatz in der Parodontalbehandlung zu erfüllen: Eine Antibiotikaempfindlichkeit der pathogenen Bakterien vorausgesetzt, sollen sie eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen, so dass der Wirkstoff nach der Resorption im Magen-Darm-Trakt möglichst vollständig dem Organismus zur Verfügung steht, um anschließend durch das Saum- oder Taschenepithel in die parodontale Tasche auszutreten. Eine ausreichende Sulkusfluidkonzentration ist notwendig, um im Gewebe und in der Tasche vorhandene pathogene Bakterien zu eliminieren.

Die Vorteile einer antibiotischen Lokalbehandlung liegen zum einen in der Vermeidung von Resistenzbildungen in der Magen-Darm-Flora sowie der Vermeidung systemischer Nebenwirkungen. Es können hohe Wirkstoffkonzentrationen unmittelbar am Ort der Erkrankung erreicht werden wodurch eine geringere Medikamentenmenge ausreicht. Des Weiteren besteht durch die Unabhängigkeit der Patientencompliance ein klarer Vorteil gegenüber der systemischen Verabreichung. Als Nachteil dagegen stehen die höheren Kosten, der Zeitaufwand und die Wirkungslosigkeit auf Bakterienstandorte in anderen Mundhöhlenbereichen, von wo aus eine Reinfektion möglich ist (Plagmann 1998).

## **Tetrazykline**

Zu den heute noch verwendeten Vertretern der Tetrazyklin-Familie gehören Doxycyclin, Minocyclin und Tetrazyklin. Sie besitzen alle das Naphthacen-Ringsystem als chemische Grundstruktur und unterscheiden sich nur in der Zusammensetzung ihrer Seitenketten. Das Wirkspektrum ist das gleiche, allerdings haben die unterschiedlichen Seitenketten Einfluss auf das pharmakokinetische Verhalten der einzelnen Vertreter (Simon und Stille Hrsg. 1997, Lemmer und Brune Hrsg. 2004).

Tetrazykline haben eine hohe Affinität zu den bakteriellen 70-S-Ribosomen im Gegensatz zu den 80-S-Ribosomen der Säuger, die nur bei Überdosierungen angegriffen werden. Die Tetrazykline hemmen durch ihre Anlagerung an beide Untereinheiten der bakteriellen Ribosomen die Proteinbiosynthese und wirken damit bakteriostatisch. Ihr Wirkungsspektrum reicht von allen Bakterienarten über Mykoplasmen, Chlamydien und Rickettsien bis zu einigen Protozoenarten. Durch ihre hohe Lipophilie werden sie zu 90 % resorbiert (Forth 2001) und besitzen eine Halbwertszeit von 6 bis 8 Stunden (Hellenbrecht 1988).

Tetrazykline hemmen zum einen die oxidative Aktivierung von pro-Matrixmetallproteinasen und zum anderen direkt die aktivierte Form des Enzyms (Ryan et al. 2001). Des Weiteren geht man davon aus, dass sie die Freisetzung von Zytokinen beeinflussen und wahrscheinlich sogar die Produktion von Matrix Bestandteilen hochregulieren können (Ryan und Ashley 1998, Schneir 1990).

Aufgrund verschiedener, günstiger Eigenschaften wird Doxycyclin den anderen Tetrazyklinen vorgezogen: Hierzu zählen die verlängerte Serumhalbwertszeit, bessere Absorption und höhere Compliance. Da nur eine Dosis/Tag (Pascale et al. 1986) erforderlich ist, und geringere gastro-intestinale Nebenwirkungen auftreten, reduziert sich das Risiko für einen Therapieabbruch. In-vitro-Studien zeigten eine größere Empfindlichkeit der pathogenen Bakterien gegenüber Doxycyclin im Vergleich zu Tetrazyklin (Gordon und Walker 1993). Aber auch Minocyclin, als lipophilster Vertreter, zeigt eine gute inhibierende Wirkung auf Parodontitis-assoziierte Bakterien (O'Connor et al. 1990, Walker et al. 2004).

## **Metronidazol**

Metronidazol gehört zur Gruppe der Nitroimidazole. Es wird in empfindlichen Keimen angereichert und wirkt im Bakterienstoffwechsel als Elektronenakzeptor. Dadurch wird die Nitro-Gruppe zu einer Hydroxylamingruppe reduziert, die durch Komplexbildung oder Induktion von Strangbrüchen die DNS der Keime schädigt, menschliche Zellen werden nicht gestört (Plagmann Hrsg. 1998). Das Antibiotikum wird zu 80% resorbiert und besitzt eine Halbwertszeit von 6 bis 8 Stunden (Forth Hrsg. 2001).

In der Zahnheilkunde wird Metronidazol in Form eines flüssigen Gels, Elyzol-Gel, als lokales Therapeutikum gegen anaerobe parodontopathogene Bakterien verwendet. Seine Indikation besteht auch in der Behandlung von akuten nekrotisierenden Gingivitiden und Parodontitiden (van Winkelhoff et al. 1992).

## **Moxifloxacin**

Moxifloxacin zählt zu der Gruppe IV der Fluorchinolone. Diese stellen die Weiterentwicklung des Ausgangsstoffes Nalidixinsäure dar und haben als gemeinsames Strukturmerkmal eine Ethypyridoncarbonsäure-Gruppe. Sie verfügen über eine verbesserte Aktivität gegenüber anaeroben Mikroorganismen (PEG 1998).

Das Antibiotikum inhibiert die Replikation, Transkription und Reparatur bakterieller DNA indem es die, für diese Funktion zuständige Topoisomerase II und IV hemmt. Moxifloxacin wird bei systemischer Gabe zu 91% resorbiert und besitzt eine Halbwertszeit von ungefähr 13 Stunden. Als Nebenwirkungen können, wie bei den meisten Antibiotika, gastrointestinale Störungen, Geschmacksirritationen und anderes auftreten (Forth Hrsg 2001, Helwig 1989, Estler 1993, BPI 1993).

In-vitro-Studien bezüglich der Wirksamkeit von Moxifloxacin auf parodontopathogene Mikroorganismen weisen positive Ergebnisse auf (Eick und Pfister 2004). Es erscheint ein vielversprechender Kandidat in der adjuvanten systemischen Therapie von *A. actinomycetemcomitans* assoziierten parodontalen Erkrankungen zu sein (Müller et al. 2002).

### 3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die keimreduzierende Wirkung der Tetrazyklinpräparate Tetrazyklin, Doxycyclin und Minocyclin sowie die von Metronidazol und Moxifloxacin gegenüber den parodontopathogenen Mikroorganismenstämmen *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M5-1-2 im Zusammenhang mit Gingivafibroblasten untersucht werden. Weiterhin werden der Einfluss der Antibiotika und Bakterien auf die Freisetzung von Matrixmetallproteinase-3 aus gingivalen Fibroblasten und der Abbau der Enzyme durch *P. gingivalis* analysiert.

Untersucht werden drei verschiedene Antibiotikadosierungen: die subinhibitorische Konzentration ( $1/4$  MHK), die Konzentration entsprechend der Wirkstoffkonzentration im Sulkusfluid nach systemischer Applikation und  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ , welche der Konzentration bei lokaler Gabe (high level) entspricht. Der eliminierende Effekt wird nach Einwirkzeiten von einer, sechs und 18 Stunden gemessen.

Ebenfalls nach diesen Zeiträumen wird die Menge der aus Fibroblasten freigesetzten MMP-3 gemessen. Hier interessiert die Wirkung der Antibiotika in den verschiedenen Konzentrationen sowie der Effekt der Bakterienstämme.

Weiterhin soll untersucht werden, ob sich niedrige MMP-3 Werte bei Anwesenheit von *P. gingivalis* durch einen proteolytischen Abbau erklären lassen. Das heißt, die Studie soll die Frage beantworten, inwieweit Antibiotika und Bakterien modulierend in den Prozess der MMP-3 Freisetzung aus Gingivafibroblasten eingreifen.

## 4 Methodik

In diesem Abschnitt werden die drei Teilversuche zur Ermittlung der Ergebnisse dargestellt

- I. Untersuchung der konzentrationsabhängigen Wirkung verschiedener Antibiotika auf parodontopathogene Keime
- II. Ermittlung des Einflusses von Antibiotika bzw. parodontopathogener Keime auf die Freisetzung von Matrixmetallproteinase-3 aus gingivalen Fibroblasten mittels ELISA
- III. Überprüfung des Abbaus von Matrixmetallproteinase-3 durch *P. gingivalis* mittels Proteingelelektrophorese

### 4.1 Die Zellen und deren Passage

Für die Versuche I und II wurden primäre gingivale Fibroblasten verwendet. Als Nährmedium diente Dulbecco modified essential medium (DMEM) (Gibco Invitrogen Cooperation, UK) dem 10% fetales Kälberserum (FKS) (Gibco BRL, Paisley, UK) hinzugefügt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Dabei bildeten die Zellen auf dem Boden der Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen, Germany) einen einschichtigen Zellrasen (Monolayer), der zwischen der vierten und achten Passage für die Versuchsdurchführung verwendete wurde.

Alle für die Versuchsdurchführung verwendeten Lösungen und Medien wurden vorbereitend auf 37°C erwärmt. Die Versuche wurden zur Realisierung steriler Bedingungen in der Sterilbox (Hera safe, Heraeus Instruments, Hanau, BRD) durchgeführt.

Zum Versuchsbeginn wurde das Zellkulturmedium aus den Flaschen abgesaugt und danach die Zellen mit 12 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde anschließend 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom GmbH, Berlin, BRD) zugegeben, gleichmäßig über den Flaschenboden verteilt und zehn Minuten bei 37°C im Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau, BRD) inkubiert. Anschließend wurden 2 ml DMEM mit 10% FKS in die Flaschen gegeben und die Zellen darin gelöst. Dieses Zell-Medium-Gemisch wurde aus den Flaschen abgesaugt, in ein 12 ml Tube gegeben und 4 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und mit den sich noch am Boden des Röhrchens befindlichen Zellen mit 2 ml DMEM mit 10% FKS gut durchmischt

und in ein steriles Becherglas gegeben. Das Becherglas wurde bis 40 ml mit DMEM mit 10% FKS aufgefüllt und zu je 1 ml pro Well auf 1½ 24-Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert.

## **4.2 Bakterienstämme**

Die verwendeten Bakterienstämme *P. gingivalis* M5-1-2 (klinisches Isolat) sowie *P. gingivalis* ATCC 33277, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 und *A. actinomycetemcomitans* Y4, die aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, BRD) stammten, wurden einen Tag vor Versuchsbeginn mit sterilen Wattetupfern auf Schaedler-Agarplatten (Oxoid, Basingstoke, UK) überimpft. Die *A. actinomycetemcomitans*-Stämme wurden zur Kultivierung in einen Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C gegeben. Die beiden *P. gingivalis* Stämme wurden im Anaerobiertopf unter Verwendung von Anaero Gen™ (Oxoid, Basingstoke, UK) angezüchtet.

### **Einstellen der Bakteriendichte**

Bei allen Versuchsansätzen wurden Bakteriensuspensionen auf eine Dichte von OD<sub>640nm</sub> = 0,1 am Fotometer eingestellt. Dies entsprach einer Keimkonzentration von ca. 10<sup>8</sup> pro ml. Dazu wurde der am Vortag auf die Agarplatten überimpfte Erreger unmittelbar vor Versuchsbeginn mittels steriler Wattestäbchen (Nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland) in einem, mit 2 ml einfach konzentriertem Medium 199 (Gibco BRL, Paisley, UK) gefüllten Röhrchen gelöst. Nach Eichung des Gerätes mit reinem Medium 199 wurde die erforderliche Dichte der Bakteriensuspension durch Zugabe von entweder Medium oder Bakterien erreicht und im Anschluss die Bakteriensuspension im Verhältnis 1 : 4 zum Zellkulturmedium DMEM (ohne FKS) hinzugegeben. Als Kontrolle diente Medium mit PBS, das im gleichen Verhältnis zugefügt wurde.



### 4.3 Antibiotika

Verwendet wurden das Fluorchinolon Moxifloxacin (Avalox® Bayer AG, Wuppertal, Deutschland), Metronidazol (Metronidazol i.v., Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und die Tetrazyklinpräparate Tetrazyklin (Tetrazyklin Wolff®, Wolff, Bielefeld, Deutschland), Doxycyclin (Doxycyclin Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und Minocyclin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland).

#### Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Mit der Hilfe eines Etest® (Viva Diagnostika, Soelna, Schweden) konnte für jeden Referenzstamm die MHK gegenüber den untersuchten Antibiotika Moxifloxacin, Tetrazyklin und Metronidazol ermittelt werden. Dabei wurde auf eine mit dem jeweiligen Bakterium beimpfte Schaedler-Agar-Platte ein Eteststreifen gelegt, der jeweils das entsprechende Medikament in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt. Die Platte wurde bei 37°C ca. 48 Stunden im CO<sub>2</sub> Inkubator (*A. actinomycetemcomitans*) oder anaerob (*P. gingivalis*) inkubiert. Danach konnte vom Eteststreifen die niedrigste Konzentration, bei der es nicht zum Wachstum des Keims kam, als minimale Hemmkonzentration abgelesen werden (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Übersicht über die minimale Hemmkonzentration (MHK) bei den verwendeten Bakterien mit den verschiedenen Antibiotika

Bakterien	Metronidazol	Moxifloxacin	Tetrazykline
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	1,5 µg/ml	0,032 µg/ml	0,125 µg/ml
<i>P. gingivalis</i> M5-1-2	1,5 µg/ml	0,032 µg/ml	0,125 µg/ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4	> 256 µg/ml	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	> 256 µg/ml	0,125 µg/ml	0,125 µg/ml

#### 4.4 Versuchsansatz I: Untersuchung der konzentrationsabhängigen antibakteriellen Wirkung

Für alle Versuche wurden folgende Konzentrationen der jeweiligen Antibiotika (Metronidazol, Moxifloxacin und Tetrazyklinpräparate) verwendet (s. Tabelle 2):

- AI: Medium ohne Antibiotika (Kontrolle)
- AII: Antibiotika in einer Konzentration von  $\frac{1}{4}$  der MHK (low level) bzw.  $\frac{1}{4}$  der Serumkonzentration bei *A. actinomycetemcomitans* bei der Testung mit Metronidazol aufgrund der festgestellten Resistenz
- AIII: Antibiotika entsprechend der Serumkonzentration bei systemischer Applikation (nach oraler Gabe erreichte Konzentration des Antibiotikums im Sulcusfluid)
- AIV: Antibiotika in einer Konzentration von 100 µg/ml entsprechend der Konzentration im der Sulcusfluid bei lokaler Applikation (high level)

**Tabelle 2:** Ansätze der verschiedenen Antibiotikakonzentrationen in Bezug auf die jeweiligen Bakterien

Bakterien		Metronidazol (µg/ml)	Tetrazykline (µg/ml)	Moxifloxazin (µg/ml)
P. gingivalis ATCC 33277 und M5-1-2	A II (low level)	0,4	0,03	0,01
	A III (syst level)	16	10	2,5
	A IV (high level)	100	100	100
A. actinomycetemcomitans Y4	A II (low level)	4	0,06	0,06
	A III (syst level)	16	10	2,5
	A IV (high level)	100	100	100
A. actinomycetemcomitans ATCC 33384	A II (low level)	4	0,03	0,03
	A III (syst level)	16	10	2,5
	A IV (high level)	100	100	100

Außerdem wurden Kontrollen (K) mit Zellen und Antibiotikum ohne Bakterien durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden für *A. actinomycetemcomitans* Y4, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* ATCC 33277 getrennt voneinander ausgeführt. Die Versuchsabläufe für alle vier Stämme gestalteten sich prinzipiell gleich.

### Vorbereitung der Antibiotikallösung

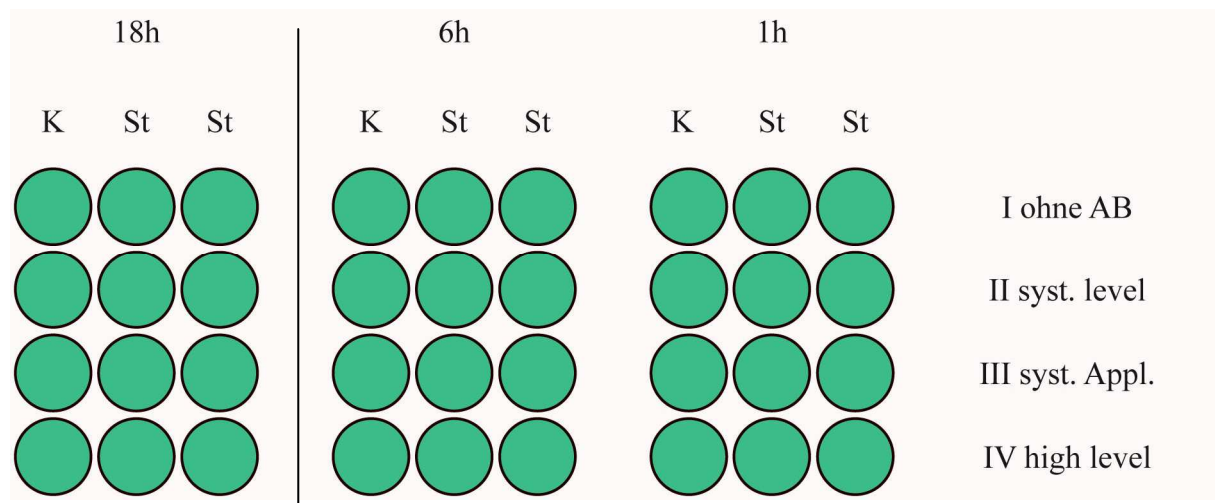
Pro Antibiotikakonzentration wurde in dem Versuchsansatz jeweils 2 ml der Lösung für die Kontrolle (K) und 4 ml für die mit dem jeweiligen Antibiotika und der Bakterienstamm versehenen Suspension (St) benötigt. Zunächst wurde die aus reinem Zellmedium bestehende Referenzlösung (AI) und danach weiteres Zellkulturmedium DMEM mit den drei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen (AII – IV) versehen (s. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Vorbereitung der Ansätze für die Kontrollen (KI - IV) und die Stämme (StI - IV) mit der jeweiligen Antibiotikakonzentration

Ansätze	DMEM (ml)	PBS (ml)	Antibiotikum (ml)
KI	1,4	0,6	Ohne
KII	1,4	0,4	0,2 (low level)
KIII	1,4	0,4	0,2 (syst.appl)
KIV	1,4	0,4	0,2 (high level)
StI	2,8	1,2	Ohne
StII	2,8	0,8	0,4 (low level)
StIII	2,8	0,8	0,4 (syst. appl.)
StIV	2,8	0,8	0,4 (high level)

Die am Vortag mit dem Zell-Medium-Gemisch versehenen 24-Well Platten wurden dem Inkubator entnommen, um unter dem Mikroskop die Bildung einer konfluenten Monolayer zu überprüfen. Unter der Laminarbox wurde dann das Medium von den Zellkulturplatten abpipettiert und die bewachsenen Platten mit jeweils 1 ml PBS pro Well gewaschen.

Die vorbereiteten Ansätze der Kontrolllösung und der Stammlösung wurden nun separat durchmischt und zu je 0,5 ml in die einzelnen Wells pipettiert (s. Abb.1). Anschließend wurden die Platten im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 1, 6 und 18 Stunden wurde das Medium aus den jeweiligen Wells entnommen und entsprechend weiterverarbeitet.



**Abb.1:** Pipettierschema der Kontrolllösung (KI –IV) und der Bakterienstammlösung (StI – IV) auf die 1 ½ 24-Wellplatten mit den jeweiligen Inkubationszeiten

### Bestimmung der Bakterienzahlen

Um die Anzahl der in den Zellkulturen vorkommenden Bakterien zu untersuchen, wurde nach 1, 6 und 18 Stunden jeweils 10 µl aus den mit dem Überstand der Bakterienstammlösung (St) gefüllten Wells entnommen und auf Schaedler-Agarplatten ausgestrichen. Zuvor wurde bei dem 1 Stunden-Versuch eine Verdünnung von 1:1000 mit PBS hergestellt.

Alle Platten wurden dann bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wobei *P. gingivalis* anaerob kultiviert werden musste. Nach ca. vier Tagen für *A. actinomycetemcomitans* und einer Woche für *P. gingivalis* konnten die Zahlen der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) als Maß für die Bakterien durch Auszählen ermittelt werden.

### Entnahme von Zellkulturüberständen zur späteren Bestimmung von MMP-3

Nach der Inkubationszeit wurden aus den jeweiligen Wells je 450 µl der Zellsuspension entnommen und in je eine Eppendorftube pipettiert. Zur Entfernung der Zellreste wurden die Tubes bei 14000 U/min für 10 Minuten in der Eppendorfzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415c, Sarstedt, Nürmbrecht) zentrifugiert. Anschließend wurden 350 µl des Überstandes entnommen, in Cryoröhrchen gefüllt und bei –20°C eingefroren.

## **4.5 Versuchsansatz II: Nachweis von MMP-3 aus den Überständen mittels ELISA**

Mit Hilfe des Human MMP-3 CytoSets™ (Biosource, Camarillo, CA, USA) konnte die Menge des freigesetzten MMP-3 in den zuvor eingefrorenen Überständen der 1-, 6- und 18-Stundenversuche ermittelt werden. Dabei handelte es sich um ein Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA), mit dessen Hilfe Antigene (hier MMPs) spezifisch und in schon sehr geringen Mengen nachweisbar sind.

### **Prinzip**

Die Oberfläche einer Mikrotiterplatte wird mit dem für das nachzuweisende Antigen spezifischen Coating-Antikörper beschichtet. Danach wird die zu untersuchende Probe zugegeben, wobei dann die vorhandenen Antigene mit dem spezifischen Coating-Antikörper binden. Nun wird ein enzymgekoppelter Detection-Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls für das gesuchte Antigen spezifisch ist und mit diesem bindet. Nach Auswaschen aller ungebundenen Reaktanten wird ein für das Enzym spezifisches Substrat zugefügt. Dort wo Detection-Antikörper an die Antigene gekoppelt sind, bewirkt dieses einen, durch eine chemische Reaktion hervorgerufenen, Farbumschlag. Dieser ist umso intensiver, je höher die Antigenkonzentration in der Probe ist. Nach Zugabe einer Stopplösung wird die Reaktion angehalten und schließlich fotometrisch ausgewertet. Als Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe mit bekannter und ansteigender Antigenkonzentration mitgeführt, wodurch der Farbumschlag der Proben ins Verhältnis gesetzt wird. Man erlangt somit genaue Mengenwerte der dort enthaltenen Antigene.

### **Versuchsdurchführung**

Als erstes wurde 10 ml PBS mit 10 µl des Coating-Antikörpers (Human MMP3 CytoSets™ (Biosource, Camarillo, CA, USA)) gut vermischt. In jedes Well einer Polystyrol-Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Modules, Wiesbaden, BRD) wurde dann 100 µl dieser Suspension pipettiert worden. Die Platte wurde mit Klebepapier abgedeckt und für 12 bis 18 Stunden bei 2 – 8°C im Kühlschrank inkubiert.









































































































Am Versuchstag wurden die Überstände von den Platten entfernt und pro Well 200 µl Blocking Solution (100 ml PBS + 4 g bovine serum albumine) (fraction V, Serva Elektrophoresis GmbH) zugegeben. Anschließend erfolgte ein erneutes Abdecken mit darauffolgender zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Blocking-Solution abgesaugt und die beschichtete Platte zweimal mit 200 µl und einmal mit 400 µl je Well mittels Wasch Puffer (TBS Tween) gewaschen.

Der Referenzstandard (MMP-3) wurde mit destilliertem Wasser so angesetzt, dass eine Konzentration von 10.000 pg/ml erreicht wurde. Die Standardverdünnungsreihe wurde mit diesem Referenzstandard und Verdünnungspuffer (100 ml PBS + 0,4 g bovine serum albumine) hergestellt. Die so entstandenen Konzentrationen betrugen 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 und 15,625 pg/ml.

Die Mikrotiterplatte wurde nun wie folgt pipettiert (s. Abb. 2):

Die beiden linken Spalten wurden mit jeweils 100 µl des Standards in abnehmender Konzentration befüllt. In die beiden linken Spalten der untersten Reihe wurden 100 µl Verdünnungspuffer pipettiert und in die restlichen Wells jeweils 100 µl der zu testenden Proben.

	Standard	Proben
1000 pg/ml	 	          
500 pg/ml	 	          
250 pg/ml	 	          
125 pg/ml	 	          
62,5 pg/ml	 	          
31,25 pg/ml	 	          
15,625pg/ml	 	          
Puffer	 	          

**Abb.2:** Pipettierschema der Mikrotiterplatte für ELISA

Nach Herstellerangaben wurden 2 µl Detection-Antikörper auf 5 ml Verdünnungspuffer angesetzt und jeweils 50 µl der Suspension den Standards und Proben zugegeben. Die Platte wurde abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler bei mittlerer

Geschwindigkeit inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Überstände entfernt und alle Wells dreimal mit Waschpuffer (TBS Tween) gewaschen.

2 µl Streptavidin-Horseradish-Konjugat wurde nach Packungsbeilage mit 10 ml Verdünnungspuffer angesetzt und je 100 µl in jedes Well pipettiert. Nach Abdecken wurde die Platte bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Absaugen der Überstände mit darauffolgendem Waschen der Wells mit Waschpuffer.

Nun wurden 100 µl TMB (Sigma®, Steinheim, Deutschland) zugegeben und der Versuchsansatz unabgedeckt für 10 bis 60 Minuten in einem dunklen Raum bei Raumtemperatur inkubiert. Sobald man einen deutlichen, in unterschiedlichen Abstufungen blauen Farbumschlag erkennen konnte, wurde 50 µl einer Stopplösung (0,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) hinzugegeben. Die Überstände färbten sich nun in unterschiedlichen Gelbstufen.

### **Auswertung**

Die genaue Menge der in der jeweiligen Lösung befindlichen MMPs wurde dann mit Hilfe der Standardkurven im ELISA-Reader (Spectra Rainbow, Tecan, Crailsheim, BRD) bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst und mit dem Programm Easy Wincurvelifting FIT (Spectra Rainbow, Tecan, Crailsheim, BRD) berechnet. Dazu wurde die optische Dichte des Standards (Ordinate) gegen die Konzentration des Standards (Abszisse) aufzeichnet. Von dieser so ermittelten Standardkurve konnte die Konzentration jeder einzelnen Probe abgelesen werden.

## **4.6 Versuchsansatz III: Kontrolle des Abbaus von MMP-3 durch P. gingivalis mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Um zu überprüfen, ob P. gingivalis MMP-3 spaltet, wurde mittels eines Proteingels die hergestellten Kontrollansätze nach Abbauprodukten untersucht.

### **Prinzip**

Das Prinzip der Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht im Auftrennen von Proteinen nach Molekülgröße und Ladung. Je größer die Ladung und je kleiner das Teilchen, desto schneller die Wanderung in einem Gelnetz. Der pH-Wert des eingesetzten Puffers, die Konzentration von Acrylamid und der Gehalt an Bisacrylamid in der Ausgangsmischung bestimmen die Trenneigenschaften des Gels. Neben den zu untersuchenden Proben wird zusätzlich ein Proteinstandard verwendet, der mehrere Proteine bekannter Größe beinhaltet. Weiter wird ein

sichtbarer, negativ geladener Farbstoff zugesetzt. Nach Einschalten des Stromes durchläuft die Probe zunächst ein Sammelgel und wird an der Grenze zum Trenngel in einer ca. 10 µm dicken Startzone konzentriert. Die eigentliche Trennung erfolgt nun im Trenngel. Sobald der Farbstoff das Gel durchlaufen hat, wird die Elektrophorese beendet. Die in der Probe enthaltenen Proteingruppen sind nun voneinander getrennt. Gleiche Proteine laufen in diskreten Zonen, die als Banden bezeichnet werden. Sie können anschließend durch eine Färbelösung dargestellt und fixiert werden. Der überschüssige Farbstoff wird mittels Entfärber entfernt. Die Banden können nun miteinander verglichen werden.

### Versuchsdurchführung

Als erstes erfolgte die Vorbereitung des Acrylamidgels. Dazu wurden 15 ml 10%iges Trenngel und 12,5 ml 4%iges Sammelgel hergestellt (s. Tabelle 4)

**Tabelle 4:** Herstellung des Acrylamidgels für Proteine

	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
Destilliertes H <sub>2</sub> O	1,2 ml	7,15 ml
4x Acrylamid	3,75 ml	1,25 ml
Bisacrylamid	3,05 ml	1,00 ml
Gel-Puffer	5,00 ml	3,10 ml
Glyzerin	2,00 ml	
APS	100 µl	100 µl
Temed	10 µl	10 µl

4 ml des Trenngels wurden in die im Gelgießstand eingespannten Platten gefüllt und mit einer geringen destilliertem Wasser überschichtet. Während des Polymerisationsvorgangs wurde das 4%ige Sammelgel vorbereitet, und nach Verfestigung des Trenngels ca. 2 ml davon aufpipettiert. Ein Probenkamm wurde vorsichtig eingeschoben und nach Polymerisation des Sammelgels bzw. kurz vor Versuchsbeginn wieder herausgezogen. Nun wurden die Platten in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und die Tanks außen mit Anodenpuffer und innen zwischen den Gelplatten mit Kathodenpuffer befüllt.

Zur Vorbereitung der Proben erfolgte zunächst die Einstellung der Bakterienstämme *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M5-1-2 am Fotometer auf eine OD<sub>640</sub> = 0,2.



Weiterhin wurde der MMP-3 Referenzstandard (Human MMP3 CytoSets™ (Biosource, Camarillo, CA, USA)) mit PBS auf 1 zu 20 bzw. 1 zu 50 verdünnt um unterschiedlich starke Bande zu erlangen.

Als vergleichende Kontrollen wurden sieben Ansätze hergestellt.

- |    |                            |                              |
|----|----------------------------|------------------------------|
| 1. | 10 µl MMP-3 1:50           | + 10 µl PBS                  |
| 2. | 10 µl MMP-3 1:50           | + 10 µl P. gingivalis ATCC   |
| 3. | 10 µl MMP-3 1:50           | + 10 µl P. gingivalis M5-1-2 |
| 4. | 10 µl P. gingivalis ATCC   | + 10 µl PBS                  |
| 5. | 10 µl P. gingivalis M5-1-2 | + 10 µl PBS                  |
| 6. | 10 µl MMP-3 1:20           | + 10 µl P. gingivalis ATCC   |
| 7. | 10 µl MMP-3 1:20           | + 10 µl P. gingivalis M5-1-2 |

Die Ansätze wurden für 1 ½ Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der jeweiligen Kontrollen mit je 10 µl DDT Probenpuffer vermischt und zur Denaturierung der Proteine für 5 Minuten bei 99°C in den Thermomixer compact (Eppendorf) gestellt. Danach wurden die Proben kurz in der Eppendorf Centrifuge 5414R zentrifugiert. Mittels einer kleinen Pipette wurden nun 15 µl der Ansätze in der oben genannten Reihenfolge in je eine Tasche des in der Gelkammer eingespannten Gels eingesetzt. In die sechste Tasche wurde 10 µl eines Molekulargewichtsstandard (SDS PAGE Protein Marker, Serva) aufgetragen.

Anschließend wurde eine Spannung angelegt, und mit einer Stromstärke von 30 mA gestartet. Sobald die Proben nach ungefähr einer halben Stunde die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreichten wurde die Stromstärke auf 70 mA erhöht. Als der Farbstoff das Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Die Platten wurden mittels eines Spatels vorsichtig voneinander abgehoben, danach das Gel gelöst und in einer Glasschale mit Coomassieblau circa eine Minute eingefärbt. Die Färbelösung wurde nach mehrmaligem Schwenken der Schale wieder in den Vorratsbehälter gegossen. Anschließend wurde mittels 10% iger Essigsäure so lang entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Die Lagerung des Gels erfolgte ebenfalls in Essigsäure.

### **Auswertung**

Die zu untersuchenden Proben werden mit dem Standard verglichen und zusätzliche bzw. abweichende Banden als Abbauprodukte interpretiert.

## 5 Ergebnisse

In diesem Kapitel wird der Einfluss der verschiedenen verwendeten Antibiotika auf die Zahlen der koloniebildenden Einheiten der *A. actinomycetemcomitans*-Stämme Y4 und ATCC 33384, sowie der *P. gingivalis*-Stämme ATCC 33277 und M5-1-2 aufgezeigt. Des Weiteren werden die Ergebnisse der MMP-3 Freisetzung aus Fibroblasten nach Infektion mit diesen Bakterien und verschiedenen Antibiotika dargestellt.

Da sich nach einstündiger Inkubation der Fibroblasten mit den Bakterien und Antibiotika generell keine Veränderungen zeigten, wurden die Ergebnisse nicht mit einbezogen.

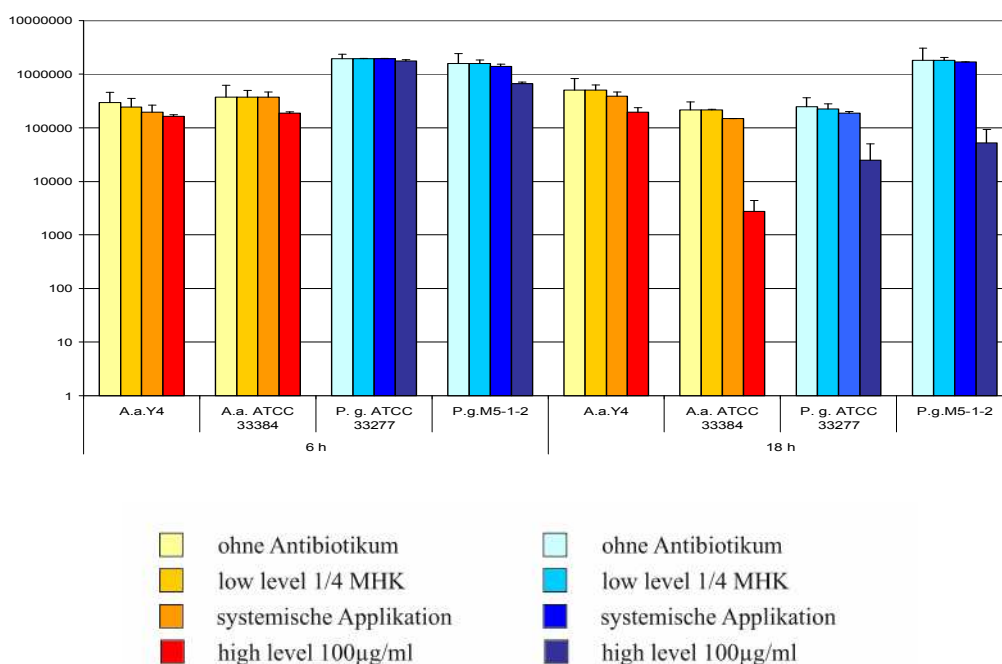
### 5.1 Wirkung der Antibiotika auf die Bakterienstämme

Bei der Analyse des Einflusses verschiedener Antibiotikakonzentrationen bei Einwirkzeiten von sechs bzw. 18 Stunden auf die KBE der Bakterien *A. actinomycetemcomitans* Y4 und ATCC 33384 sowie *P. gingivalis* M5-1-2 und ATCC 33327 fiel auf, dass bei Anwendung von Moxifloxacin eine deutliche Keimreduktion erzielt wurde, wohingegen die Tetrazyklinpräparate nur eine geringe antibakterielle Wirkung zeigten. Niedrige Konzentrationen erwiesen sich als nicht effektiv für die Eliminierung der untersuchten Mikroorganismen. Metronidazol veränderte die Bakterienzahlen nicht.

### 5.1.1 Tetrazyklin

Die antibakterielle Wirkung von Tetrazyklin war nach 18-stündiger Inkubation bei höchster Konzentration am stärksten.

Bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnte nach sechs und 18 Stunden nur eine minimale Keimreduktion konzentrationsabhängig beobachtet werden. Bei den übrigen untersuchten Bakterienstämmen war im 18-Stunden-Versuch bei einer Konzentration von 100 µg/ml Tetrazyklin eine Reduktion der KBE um ein bis zwei Log-Stufen zu erkennen, wobei es aber nie zu einer vollständigen Keimeliminierung kam (Abb. 3).



**Abb.3** Anzahl der KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach sechs und nach 18 Stunden Versuchsdauer, ohne Zugabe von Tetrazyklin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

### 5.1.2 Minocyclin

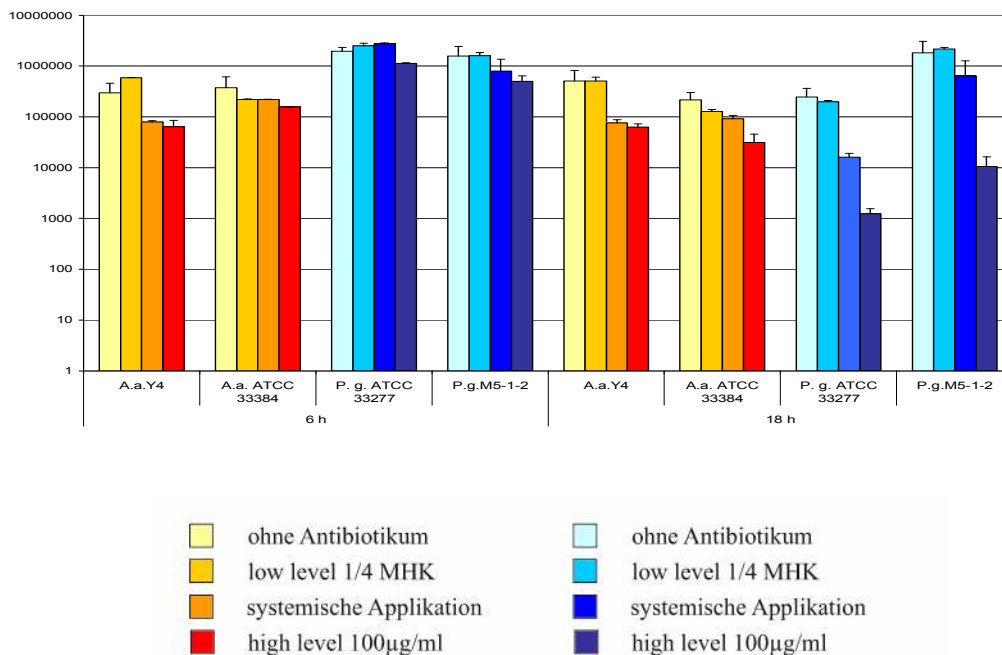
Nach sechs und 18 Stunden Inkubation mit einer Minocyclinkonzentration entsprechend der Serumkonzentration nach systemischer Applikation (syst. Level) und bei 100 µg/ml wies *A. actinomycetemcomitans* Y4 eine geringfügige Reduktion der KBE auf.

Bei *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 kam es nur nach 18 Stunden und höchster Antibiotikakonzentration zu einer leichten Senkung der Bakterienzahlen.

Nach sechsstündiger Inkubation mit 1/4 MHK und 10 µg/ml Minocyclin wurden bei *P. gingivalis* ATCC 33277 etwas höhere Erregerzahlen im Vergleich zur Kontrolle ohne

Antibiotika festgestellt. Nach 18 Stunden Einwirkzeit war dann allerdings eine deutliche, konzentrationsabhängige keimreduzierende Wirkung des Tetrazyklins zu erkennen.

Auch beim Stamm *P. gingivalis* Stamm M5-1-2 zeigte sich nach sechs Stunden eine geringe, nach 18 Stunden, vor allem bei 100 µg/ml Minocyclin, eine deutliche Verminderung der KBE (Abb. 4).



**Abb.4** Anzahl der KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach sechs und nach 18 Stunden Versuchsdauer, ohne Zugabe von Minocyclin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

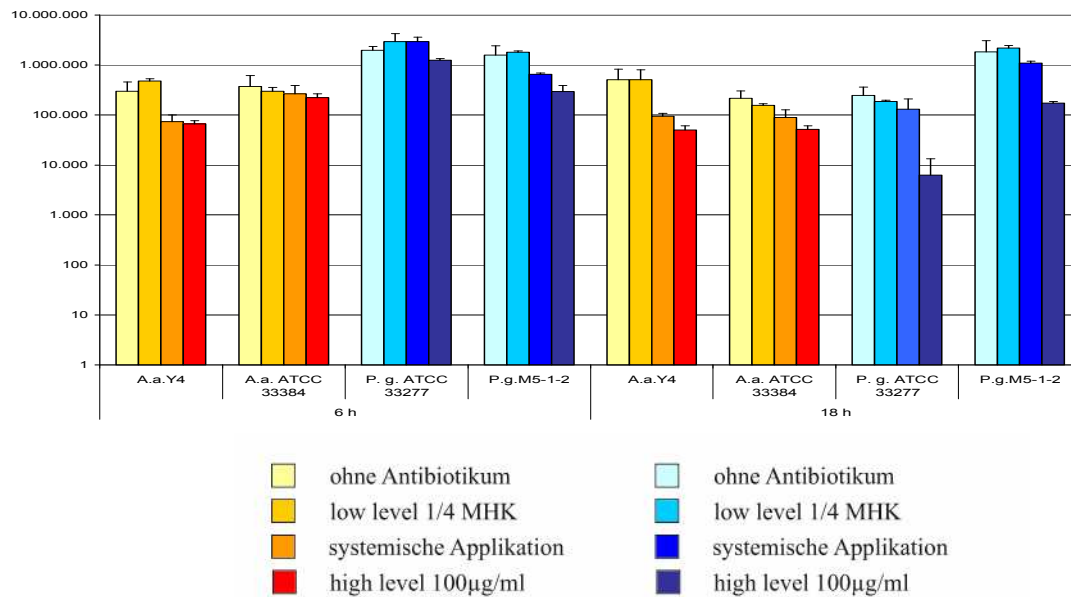
### 5.1.3 Doxycyclin

Bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnte man nach sechs und nach 18 Stunden Inkubation bei syst. Level und 100 µg/ml Antibiotikakonzentration einen leichten Abfall der KBE erkennen. Allerdings war bei 1/4 MHK nach sechs Stunden eine im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöhte Bakterienzahl vorzufinden.

Die Keimzahl von *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 verringerte sich mit steigender Doxycyclinkonzentration nach 18 Stunden Versuchszeit.

Bei *P. gingivalis* ATCC 33277 und M5-1-2 wurde nach der gleichen Zeitspanne und 100 µg/ml Antibiotikaapplikation ebenfalls eine deutliche Erregerreduktion vorgefunden.

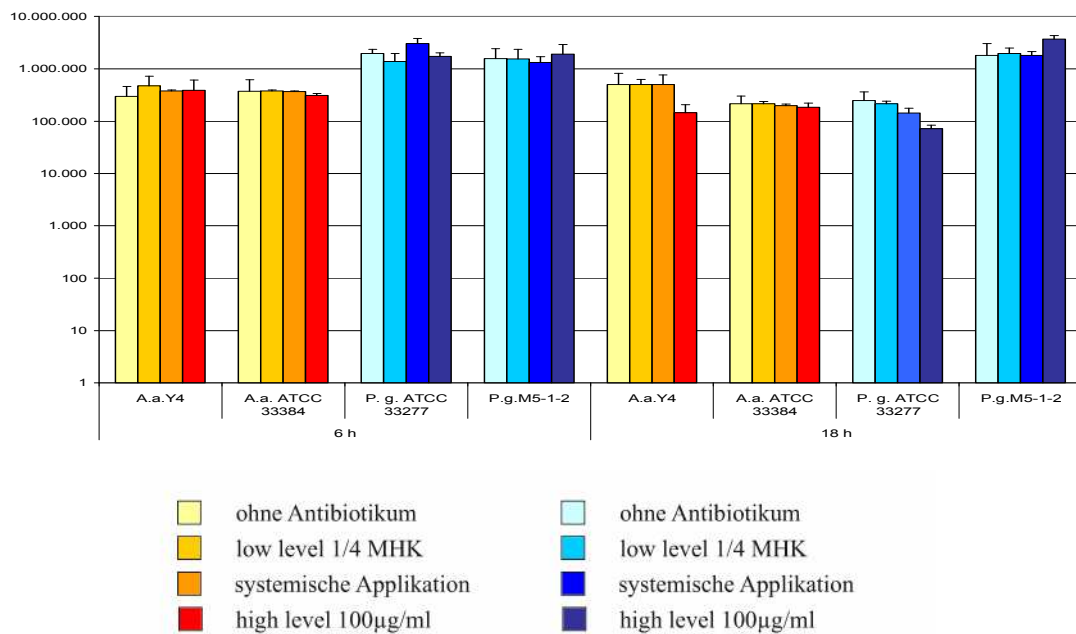
Nach sechs Stunden und niedriger Antibiotikakonzentration lag die Zahl der KBE dagegen etwas oberhalb der Kontrollen (Abb. 5).



**Abb.5** Anzahl der KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und nach 18 Stunden Versuchsdauer, ohne Zugabe von Doxycyclin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

### 5.1.4 Metronidazol

Die Ergebnisse der Versuche zeigten bei Inkubation von *A. actinomycetemcomitans* mit Metronidazol keine nennenswerte Reduktion der Keime. Allein bei *P. gingivalis* ATCC 33277 ließ sich im 18 Stunden-Versuch mit höchster Antibiotikakonzentration von 100 $\mu$ g/ml eine minimal geringe Verminderung feststellen. Bei *P. gingivalis* M5-1-2 waren in dieser Konzentration sogar höhere Bakterienzahlen als bei der Kontrolle zu finden (Abb. 6).



**Abb.6** Anzahl der KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und nach 18 Stunden Versuchsdauer, ohne Zugabe von Metronidazol, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

### 5.1.5 Moxifloxacin

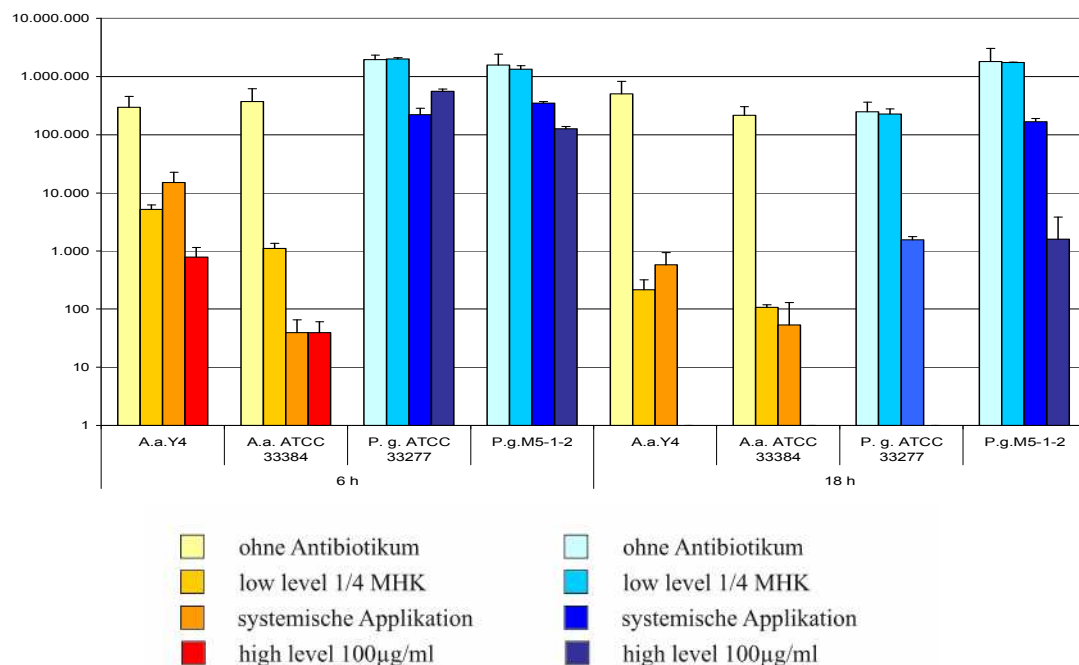
Moxifloxacin hatte von den untersuchten Antibiotika die höchste bakterizide Wirkung.

Bei allen Bakterien kam es nach Moxifloxacingabe zu einer deutlichen Reduzierung der Keime bis hin zu deren Eliminierung.

Eine Antibiotikaapplikation führte nach sechsstündiger Inkubation bei den beiden *A. actinomycetemcomitans* Stämmen zu einer deutlichen Reduktion der KBE. Eine vollständige Keimeliminierung wurde nach 18 Stunden und höchster Moxifloxacinkonzentration von 100 µg/ml erzielt.

Der bakterieneliminierende Effekt des Antibiotikums war bei *P. gingivalis* ATCC 33277 nach 18-stündiger Einwirkdauer ebenfalls deutlich zu erkennen. Auch bei diesem Stamm waren bei einer Moxifloxacinkonzentration von 100 µg/ml keine KBE mehr vorhanden.

Bei *P. gingivalis* M5-1-2 war die keimreduzierende Wirkung des Antibiotikums geringer verglichen mit den anderen Bakterienstämmen, nach 18 Stunden trat aber auch eine Reduktion um drei log-Stufen auf (Abb. 7).



**Abb.7** Anzahl der KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und nach 18 Stunden Versuchsdauer, ohne Zugabe von Moxifloxacin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

## **5.2 Freisetzung von MMP-3 aus Fibroblasten**

Die Diagramme stellen die Menge der aus den Fibroblasten sezernierten MMP-3 nach Kontakt mit den verschiedenen verwendeten Bakterien und Antibiotika dar. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines konventionellen ELISA-Tests ermittelt. Die Kontrollen zeigen die aus nicht infizierten Fibroblasten freigesetzte Menge an MMP-3, die ohne, bzw. nach Inkubation mit den verschiedenen Antibiotikakonzentrationen vorzufinden war.

Aus den Fibroblasten wurde in den Ansätzen ohne Mikroorganismen und ohne Antibiotika nach sechs Stunden ca. 950 pg/ml und nach 18 Stunden ca. 6.726 pg/ml MMP-3 freigesetzt.

### **5.2.1 Einfluss der Bakterien**

18 Stunden nach Infektion der Fibroblasten mit je einem der *Aggregatibacter* Stämme ohne Antibiotikum betrugen die sezernierten MMP-3 Werte fast das 16-fache des 6 Stunden-Wertes nach Infektion.

In Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33484 produzierten die untersuchten Zellen mit 23.809 pg/ml die größte Menge an MMP-3.

Die freigesetzte Menge an MMP-3 blieb nach Infektion der Fibroblasten mit den beiden *P. gingivalis* Stämmen unabhängig von der Antibiotikakonzentration konstant. Die gemessenen Werte waren sehr niedrig und lagen durchgehend deutlich unterhalb derer der nichtinfizierten Fibroblasten. Einzig wurden nach Zugabe von 100 µg/ml Minocyclin erhöhte MMP-3-Mengen sowohl im 6- als auch im 18-Stunden-Versuch festgestellt.

### **5.2.2 Wirkung von Tetrazyklin**

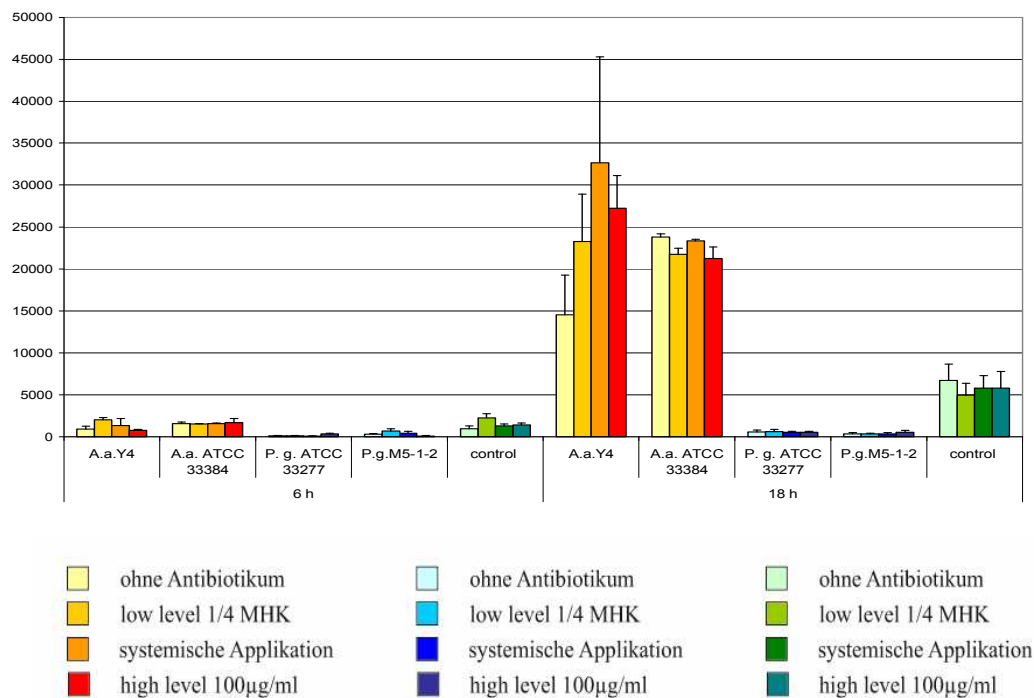
Nach 18-stündiger Inkubation der Fibroblasten mit Tetrazyklin kam es bei den Kontrollen ohne Bakterien konzentrationsunabhängig zu einem geringfügigen Absinken der Proteasenmenge.

Bei den Untersuchungen mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 waren nach 6 Stunden Inkubation mit dem Antibiotikum ähnliche Ergebnisse wie bei den Kontrollen zu erkennen. 18 Stunden nach Infektion der Zellen durch *A. actinomycetemcomitans* Y4 erhöhten sich die MMP-3 Werte deutlich, wobei der Wert auf



32.667 pg/ml MMP-3 unter Zugabe von 10 µg/ml Tetrazyklin anstieg. Bei einer Dosis von 100 µg/ml sank die Enzymmenge etwas ab.

Eine Erhöhung der Tetrazyklinkonzentration führte bei Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 auch nach 18-stündiger Inkubation zu keiner Veränderung der MMP-3-Freisetzung. Die Menge betrug ungefähr das 4-fache der Kontrollwerte (Abb. 8).



**Abb.8** Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach sechs- und 18-stündigem Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien jeweils ohne Zugabe von Tetrazyklin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

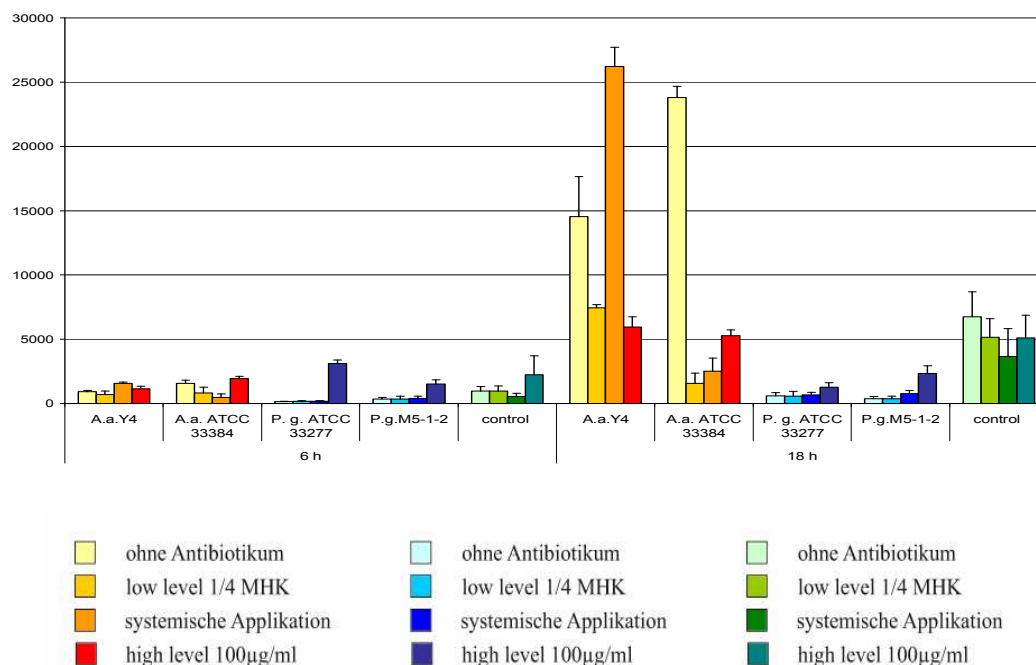
### 5.2.3 Wirkung von Minocyclin

Minocyclin zeigte von den geprüften Antibiotika die stärkste Beeinflussung der freigesetzten MMP-3-Menge. Nach 18 Stunden konnte bei den Kontrollen ohne Bakterien eine leichte Senkung der Enzymmenge beobachtet werden.

Bei Infektion der Fibroblasten mit den *A. actinomycetemcomitans*-Stämmen wurden zumeist niedrigere Spiegel an MMP-3 unter Minocyclineinwirkung gemessen. So sank der MMP-3-Spiegel nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und subinhibitorischer Konzentration sowie 100 µg/ml Minocyclin auf weniger als die Hälfte im Vergleich zu dem

Versuch ohne Antibiotikum. Die Zugabe der systemischen Konzentration (10 µg/ml) führte allerdings zu einer vermehrten Freisetzung von MMP-3.

Bei Infektion der Fibroblasten mit *P. gingivalis* ATCC 33277 war nach sechs Stunden und niedriger Antibiotikazugabe die festzustellende MMP-3 Menge nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Die Zugabe von 100 µg/ml des Antibiotikums ließ allerdings eine vermehrte Freisetzung von 3.103 pg/ml erkennen. Auch bei Infektion mit *P. gingivalis* M5-1-2 stiegen die gemessenen MMP-3 Werte sowohl im sechs als auch im 18 Stunden Versuch bei der high level Antibiotikakonzentration merklich an (Abb. 9).



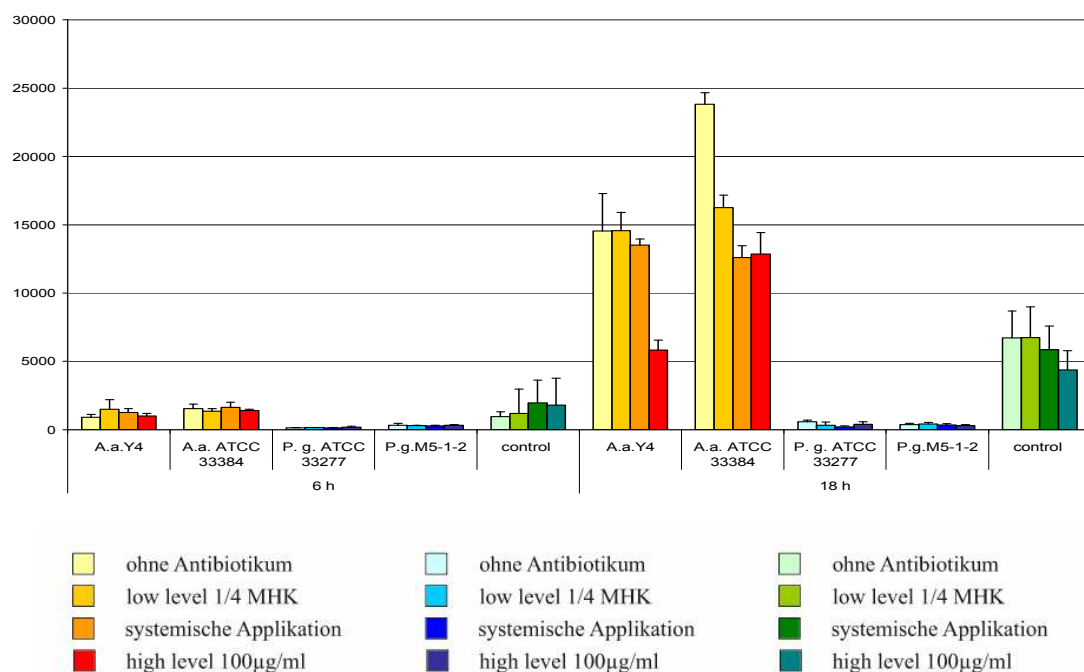
**Abb.9** Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach sechs und 18-stündigem Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien jeweils ohne Zugabe von Minocyclin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

## 5.2.4 Wirkung von Doxycyclin

In der Kontrolle ohne Bakterien war nach 18 Stunden mit steigender Doxycyclinkonzentration eine Verminderung der MMP-3 Menge gemessen worden.

Nach 18-stündiger Fibroblasteninkubation mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 war ebenfalls eine antibiotikaabhängige Reduktion der MMP-3-Sezernierung festzustellen. Dabei führte eine Konzentration von 100 µg/ml zu einer ca. 2,5-fachen Verminderung im Vergleich zu dem Wert ohne Antibiotika. Die Einwirkung von niedrig dosiertem Doxycyclin zeigte keine Veränderung der nachgewiesenen MMP-3 Menge.

Auch bei Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 gab es eine antibiotikaabhängige Verminderung der Enzymmenge, wobei hier bereits 10 µg/ml Doxycyclin reduzierend wirkten (Abb. 10).

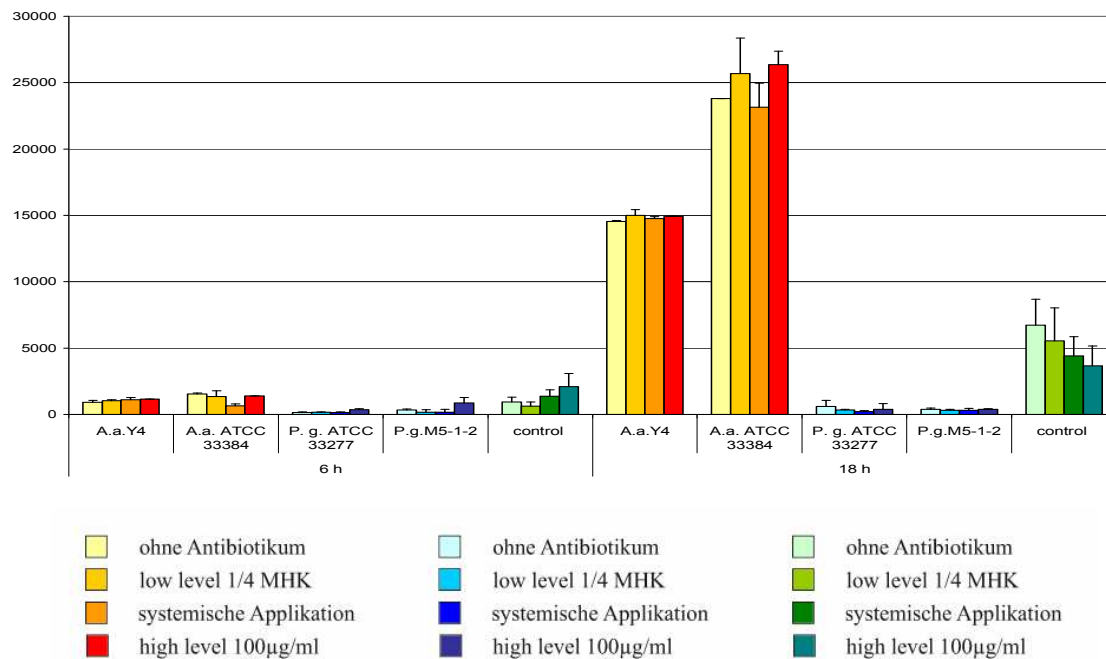


**Abb.10** Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach 6 und 18-stündigem Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien jeweils ohne Zugabe von Doxycyclin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

## 5.2.5 Wirkung von Metronidazol

Bei der Kontrolle ohne Bakterien war nach 18 Stunden eine Verminderung der MMP-3 Sezernierung entsprechend steigender Antibiotikakonzentration zu verzeichnen.

Bei den Ansätzen mit den Bakterien scheinen die unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen die Anzahl der MMP-3 nicht zu beeinflussen. Die gemessenen MMP-3 Mengen entsprachen weitestgehend den Werten ohne Wirkstoffzugabe (Abb. 11).



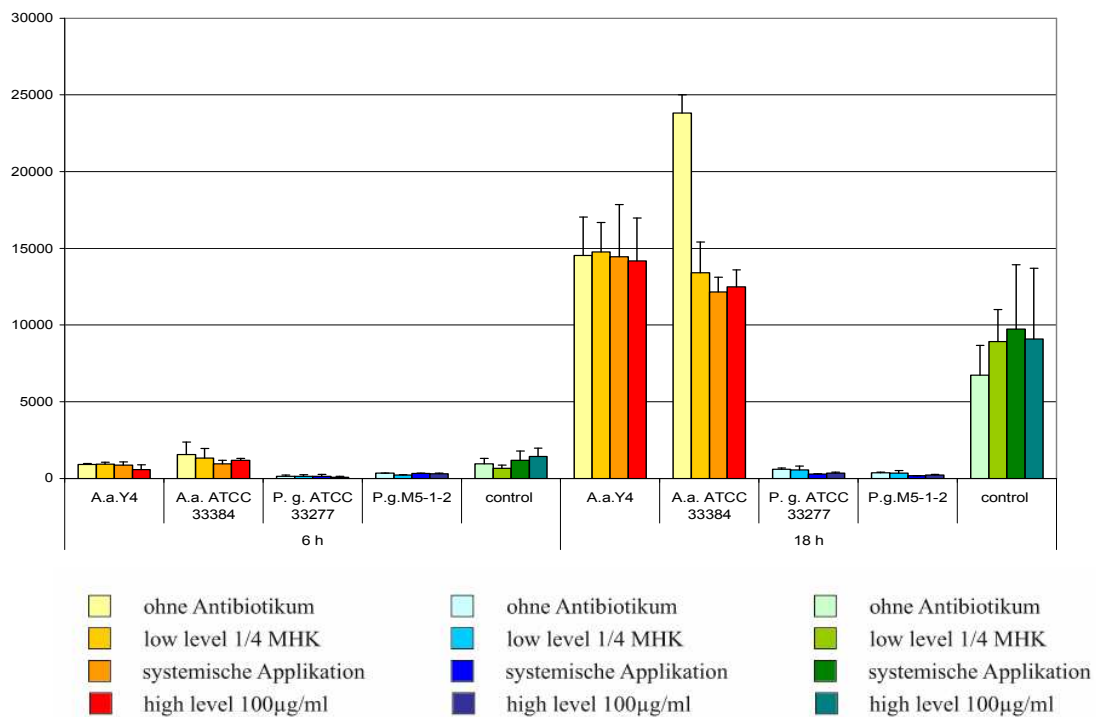
**Abb.11** Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach 6 und 18-stündigem Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien jeweils ohne Zugabe von Metronidazol, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

## 5.2.6 Wirkung von Moxifloxacin

Bei den nicht infizierten Kontrollen war mit steigender Antibiotikakonzentration eine leichte Zunahme der MMP-3 Menge zu erkennen.

Bei den Ansätzen mit *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M5-1-2 führten die unterschiedlichen Moxifloxacinkonzentration zu keiner Veränderung der MMP-3 Menge. Die gemessenen Werte blieben konstant.

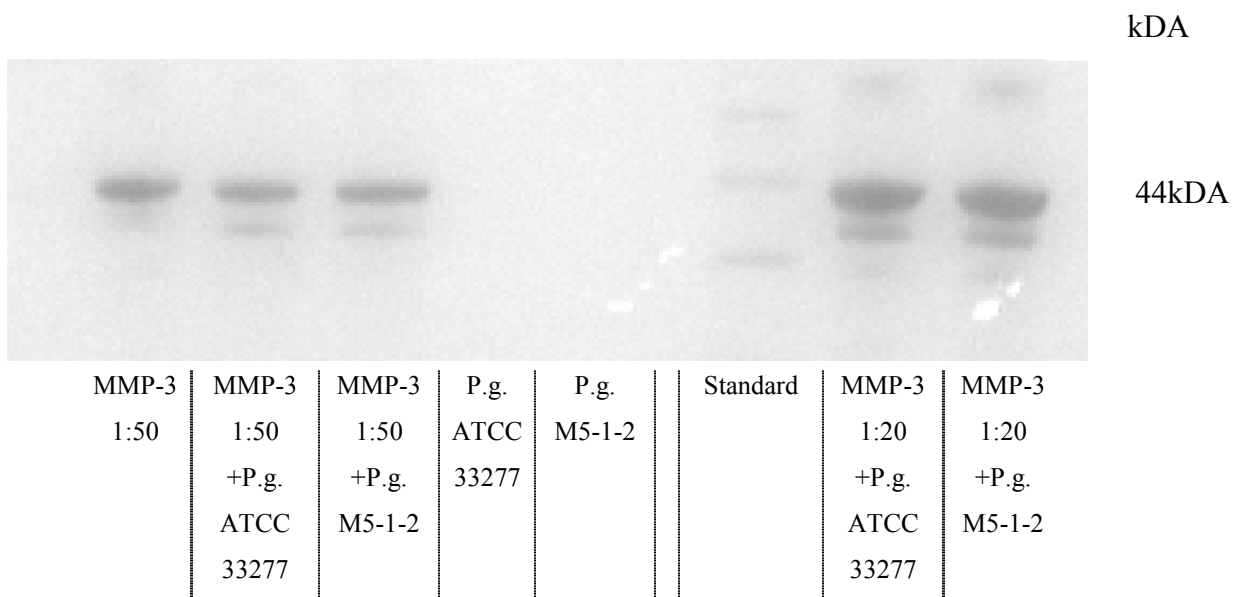
Eine antibiotikaabhängige Verminderung der freigesetzten MMP-3 war bei Infektion der Fibroblasten mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 nach 18-stündiger Inkubationszeit zu erkennen. Hierbei sank die MMP-3 Menge auf circa die Hälfte (Abb. 12).



**Abb.12** Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach sechs und 18-stündigem Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien jeweils ohne Zugabe von Moxifloxacin, bzw. mit Zugabe in unterschiedlichen Konzentrationen

### 5.3 Abbau von MMP-3 durch *P. gingivalis*

Nach Inkubation von MMP-3 mit *P. gingivalis* ATCC 33277 und M5-1-2 war nach elektrophoretischer Aufspaltung im Proteingel unterhalb der typischen 44 kDa MMP-3-Bande bei beiden Verdünnungen eine zweite Bande verstärkt erkennbar. Das deutete auf einen Abbau von MMP-3 durch *P. gingivalis* hin (Abb. 13).



**Abb.13** Proteinbanden im Acrylamidgel von MMP-3 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 allein, sowie MMP-3 nach Inkubation mit den *P. gingivalis* Stämmen im Vergleich zum Standard

## 6 Diskussion

In dieser Studie wurde zum einen die Wirksamkeit der verschiedenen Antibiotika auf die Bakterien *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 und Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 und M5-1-2 im Zusammenhang mit Gingivafibroblasten untersucht, zum anderen sollte dem Einfluss der verwendeten Antibiotika auf die Freisetzung von Matrixmetallproteinase-3 aus den mit den Mikroorganismen infizierten Fibroblasten nachgegangen werden. Weiterhin wurde die Wirkung von *P. gingivalis* auf die sezernierten MMP-3 untersucht.

Die Ursachen für Parodontitiden sind komplex. Die Gewebezerstörung, die im Rahmen der Parodontitis auftritt, ist allerdings zum größten Teil auf die Abwehrreaktion des Wirts auf die Erreger und deren Stoffwechselprodukte zurückzuführen (Haffajee und Socransky 1994). Da konservierende und chirurgische Therapien häufig nicht ausreichen, um diese Keime aus der Mundhöhle zu eliminieren, erweist sich die adjuvante Gabe von Antibiotika als sehr vorteilhaft (Walker et al. 2004, Eick und Pfister 2004).

### 6.1 Methodik

Vor allem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* sind für die Progression parodontaler Erkrankungen verantwortlich (Haffajee und Socransky 2005). Es wurden die Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* Y4 und ATCC 33384 und *P. gingivalis* M5-1-2 und ATCC 33277 gewählt. Vergleiche mit verschiedenen Stämmen einer Spezies zeigen, dass Virulenzfaktoren stark variieren und somit auch zu unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen führen können (Eick et al. 2002). Von jedem Bakterium existieren unzählige Genotypen, die sich immer fort weiterentwickeln und verändern. Durch Mutationen oder Gentransfer kommt es zu einem ständigen Wechsel von Charaktereigenschaften. Kilian et al. (2006) beschreiben Bakterien als Population von Individuen, welche sich in Bezug auf die Pathogenitätsfaktoren eigentlich unmöglich vereinheitlichen lassen.

Zudem wurde erkannt, dass viele Erreger Virulenzgene nur exprimieren, wenn sie sich in ihrem menschlichen oder tierischen Wirt befinden. Diese Virulenzfaktoren fehlen folglich bei In vitro Versuchen (Haffajee und Socransky 2005).

In vitro Modelle sind trotz allem wichtige Arbeitsmittel um den Effekt von Antibiotika auf Bakterien zu testen (Eick und Pfister 2004). Weiterhin sind solche Versuche wichtig, um zu erkennen, inwiefern unterschiedliche Antibiotikakonzentrationen und verschiedene Bakterienarten Einfluss auf die Freisetzung parodontalgewebezerstörender Enzyme aus Gewebezellen, z.B. Fibroblasten, haben. In vorliegender Arbeit wurde die Wirkung der Tetrazyklinpräparate Tetrazyklin, Doxycyclin und Minocyclin, sowie des Fluorchinolons Moxifloxacin und des Nitroimidazols Metronidazol auf die MMP-3-Freisetzung aus Fibroblasten untersucht.

Es existieren schon einige Studien zur Wirkung dieser Antibiotika auf *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* (Eick und Pfister 2004, Müller 2002, van Steebbergen 1993, Rodriguez et al. 2004). Auch die Wirkungsweise einiger Medikamente, insbesondere der Tetrazyklinpräparate (Golub et al. 1994 und 2001; Jonat et al. 1996; Pourtaghi et al. 1996; Sadowski und Steinmayer 2001) und der Bakterien (Bodet et al. 2006, Tiranathanagul et al. 2004, Pattampun et al. 2003) auf die Freisetzung und Aktivität der MMPs wurde in früheren Studien erörtert. Wie genau aber die Konzentrationen und Einwirkzeiten der Wirkstoffe Einfluss auf die Eliminierung der Keime und Freisetzung von MMP-3 haben wurde bis dato noch nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bakterienstämme einzeln geprüft. In vivo befinden sich die Mikroorganismen allerdings in der komplexen Struktur eines Biofilm, welcher eine Barriere gegen wirtseigene Abwehrmechanismen und antibakterielle Medikamente bildet (Heidemann 2005).

Die Studien wurden an gingivalen Fibroblasten vorgenommen. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Zellen im Parodont und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Parodonts. Sie sind zum einen die Produzenten der extrazellulären Matrix und regulieren zum anderen durch z. B. Matrixmetallproteinase deren Umbau (Hassell 1993). Gingivale Fibroblasten scheinen durch die Zytokin-induzierbare Produktion von MMP-1 und MMP-3 eine wichtige Rolle bei der parodontitisbedingten Gewebeerstörung zu spielen (Beklen et al. 2007). Die Freisetzung verschiedener MMPs nach Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* wurde in einigen Studien bereits untersucht (Chang et al. 2002, Bodet et al. 2007, Zhou und Windsor 2006). Jedoch können



auch TNF- $\alpha$ , IL 1 $\beta$  und EGF gingivale Fibroblasten zu einer vermehrten MMP-3 Sezernierung stimulieren (Beklen et al. 2006, Domeij 2002).

Für die Gewährleistung möglichst gleich bleibender und reproduzierbarer Bedingungen wurden Zellen in niedriger Passage verwendet. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Studie die Gingivafibroblasten in einem Monolayer kultiviert, was nur als vereinfachtes Modell der komplexen tatsächlichen Gegebenheiten In vivo angesehen werden kann, da die Zellen naturgemäß immer mehrschichtig und mit anderen Zellen im oralen Schleimhautepithel oder Bindegewebe vorkommen. Zur Untersuchung der Interaktionen von parodontopathogenen Keimen und antibakteriellen Wirkstoffen mit Fibroblasten ist ein einfacher Zellrasen jedoch gut geeignet. Experimente mit Multilayer-Schichten könnten in weiterführenden Versuchen durchgeführt werden.

MMPs spielen eine wichtige Rolle beim Umbau der extrazellulären Matrix. Bei Vorliegen von parodontalen Entzündungen steigern gingivale Fibroblasten die Sekretion Matrix abbauender Metallproteinasen. Vor allem MMP-3 spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Progredienz der Parodontitis (Alpagot 2001; Beklen et al. 2006). Dieses Enzym führt unter anderem zur Aktivierung weiterer Prokollagenasen.

Die Aktivierung von MMPs scheint ein wichtiger Schritt in der wirtsbedingten Gewebeerstörung der Pathogenese der Parodontitis zu sein. Als neuen Ansatz in der Parodontitistherapie wird vorgeschlagen, Medikamente einzusetzen, welche die Wirtsantwort beeinflussen und die MMP bedingte Gewebeerstörung unterdrücken bzw. hemmen (Chang 2002) oder erhöhte MMP-Aktivität reduzieren könnten (Preshaw et al. 2004).

Es existieren bereits einige Studien über die Wirkung verschiedener Tetrazyklinpräparate (Golub et al. 1983, 1994 und 2001, Greiner et al. 2002, Preshaw et al. 2004, Rifkin et al. 1994, Ryan et al. 2001, Sorsa et al. 2006, Sadowski und Steinmeyer 2001) sowie von Metronidazol (Pourtaghi et al. 1996) auf MMPs. Der Effekt von Moxifloxacin auf die Enzyme wurde bis dato noch nicht erforscht.

Bislang wurden viele Untersuchungen zu MMPs in Form von In vitro-Versuchen durchgeführt, wohingegen über Aktivierungsprozesse In vivo noch nicht viel bekannt ist (Sorsa et al. 2004). Dieses müsste in weiterführenden Untersuchungen erörtert werden.

## **6.2 Wirkung von Antibiotika auf die Bakterienstämme**

In vorliegender Studie wurde der Einfluss verschiedener Antibiotikakonzentrationen bei Einwirkzeiten von sechs bzw. 18 Stunden auf die KBE von je zwei Bakterienstämmen der Spezies *A. actinomycetemcomitans* sowie *P. gingivalis* im Zusammenhang mit Gingivafibroblasten untersucht.

Bei Anwendung von Moxifloxacin wurde vor allem bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine deutliche Keimreduktion erzielt, wohingegen die Tetrazyklinpräparate nur eine geringe antibakterielle Wirkung zeigten. Niedrige Konzentrationen erwiesen sich als nicht effektiv in der Eliminierung der untersuchten Mikroorganismen. Auch der Zeitfaktor schien eine entscheidende Rolle auf die antimikrobielle Wirkung zu haben. Nach 18-stündigem Verlauf waren keimreduzierende Effekte deutlicher zu erkennen als bei kürzerer Einwirkdauer. Im Gegensatz dazu führte der Einfluss von Metronidazol zu keiner Senkung der Bakterienzahlen.

### **Wirkung von Tetrazyklin**

Die höchste keimreduzierende Wirkung wurde bei 18-stündiger Einwirkdauer und höchster Antibiotikakonzentration von 100 µg/ml erreicht. Die geringste Wirkung wies Tetrazyklin bei Infektion der Gingivafibroblasten mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 auf.

Die Empfindlichkeit gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen kann von Spezies zu Spezies und zwischen den verschiedenen Stämmen z.T. stark variieren (Eick und Pfister 2004).

In der klinischen Studie von Rodrigues et al. (2004) wurde eine Keimreduzierung durch Tetrazyklin beobachtet, wobei es, wie auch in den vorliegenden Versuchen, nie zu einer vollständigen Eliminierung von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* kam.

Ursächlich für die geringe Wirksamkeit ist möglicherweise auch eine Resistenzentwicklung, welche schon in anderen Studien nachgewiesen wurde (Walker et al. 2004, Madinier 1999, Rodrigues et al. 2004, van Winkelhof et al. 2005).

### **Wirkung von Minocyclin**

Minocyclin wirkte auf die *A. actinomycetemcomitans* Stämme bereits nach sechs Stunden in systemischer und lokaler Konzentration keimreduzierend. Bei den *P. gingivalis*-Stämmen

erkannte man dagegen, vor allem nach 18 Stunden bei hohen Konzentrationen, sinkende Keimzahlen. Minocyclin wird von gingivalen Fibroblasten aktiv in den Intrazellularraum aufgenommen und angereichert, dies wurde in einer Studie von Yang et al. (2002) gezeigt. Das erklärt die Keimzahlreduzierung vor allem bei längerer Inkubationsdauer. Intrazellulär sonst nicht erreichbare Bakterien können somit eliminiert werden.

In einer In vivo-Studie von van Steenberg et al. (1993) wurde nach lokaler Gabe von Minocyclin eine Verminderung der Keimzahlen von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* festgestellt. Ebenfalls wurde, im Vergleich zur Kontrolle ohne das Antibiotikum, ein Rückgang der Taschentiefe gemessen.

### **Wirkung von Doxycyclin**

Eine geringe Keimreduktion konnte man bei Inkubation mit Doxycyclin bei längerer Einwirkzeit und hoher Dosis erkennen.

Im Rahmen der Parodontitistherapie wird Doxycyclin häufig angewendet und stellt bei lokaler Antibiotikaapplikation das Mittel der Wahl dar. In der Studie von Feres et al. (1999) waren keimreduzierende Effekte auf *P. gingivalis* und andere parodontopathogene Keime nur gering. In vitro-Untersuchungen von Eick und Pfister (2004) ergaben hingegen, dass Doxycyclin *A. actinomycetemcomitans* bei Konzentrationen im systemischen Level vollständig eliminieren kann. Auch auf *P. gingivalis* wirkt es in hohen Dosen keimreduzierend. Eine vollständige Abtötung erfolgte, wie auch in unseren Untersuchungen gezeigt, nicht.

Die im Vergleich zur Kontrolle erhöhten Bakterienzahlen von *P. gingivalis* bei dem 6-Stunden-Versuch mit niedrigen Konzentrationen könnten auf schnelle Internalisierung der Keime in die Fibroblasten und deren intrazelluläre Vermehrung zurückzuführen sein.

In einer Studie von Karimbux et al. (1998) wurde bewiesen, dass Doxycyclin den inhibitorischen Effekt der parodontalen Infektion auf die Kollagensynthese ausschalten kann. Somit scheinen vor allem die Nebeneffekte dieses Antibiotikums zu guten klinischen Ergebnissen zu führen.

## Wirkung von Metronidazol

Die Ergebnisse der Versuche zeigten bei Inkubation von *A. actinomycetemcomitans* mit Metronidazol keine nennenswerte Reduktion der Keime. Allein bei *P. gingivalis* ATCC 33277 im 18-Stunden-Versuch mit höchster Antibiotikakonzentration von 100 µg/ml ließ sich eine minimale Verminderung erkennen, wohingegen bei *P. gingivalis* M5-1-2 in dieser Konzentration höhere Bakterienzahlen als bei der Kontrolle zu finden waren.

Das Wirkspektrum von Metronidazol bezieht sich vor allem auf anaerobe Keime und hat keine oder nur geringe Aktivität gegen aerobe bzw. mikroaerophile Bakterien (Walker et al. 2004). Die meisten *A. actinomycetemcomitans* Stämme besitzen eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum (Madinier et al. 1999; Müller et al. 2002). Auch in den Vorversuchen der hier vorliegenden Studie erwiesen sich diese Keime als resistent. Aus diesem Grund wird Metronidazol meist in Kombination mit Amoxicillin verabreicht, um *A. actinomycetemcomitans* assoziierte Parodontitiden zu therapieren (van Winkelhoff et al. 1992, Pavicic 1994).

Das hier untersuchte Nitroimidazol wird vor allem zur Therapie chronischer Parodontitiden eingesetzt. Etliche Studien belegen den therapeutischen Vorteil einer adjuvanten Metronidazolgabe zusätzlich zum Scaling und Rootplaning gegenüber alleiniger mechanischer Therapie (van Winkelhoff et al 1992, Loesche 1992, Soder 1990, Teles et al. 2006). Somit zeigt sich, dass In vivo offensichtlich eine größere Wirksamkeit gegenüber *P. gingivalis* als in unseren In vitro-Versuchen besteht.

Die in unserer Studie fehlende Wirksamkeit gegenüber dem anaeroben *P. gingivalis* M5-1-2 bzw. die nur geringe Keimreduktion vom ATCC 33277-Stamm ist auffällig, da in den Vorversuchen eine MHK von 0,125 µg/ml ermittelt wurde und somit das Bakterium als relativ sensibel einzustufen wäre. Es könnten eventuell Interaktionen mit Fibroblasten dafür verantwortlich sein, welche zu einer Veränderung des Wirkstoffes geführt haben. Dadurch kann der antibakteriellen Mechanismen abgeschwächt bzw. ganz aufgehoben worden sein, was die fehlende Wirksamkeit gegenüber dem sonst empfindlichen *P. gingivalis* erklärt. In der Studie von Eick und Pfister (2004) führte Metronidazol konzentrationsabhängig zu einer Reduktion von *P. gingivalis*. Dort wurde allerdings der Zusammenhang mit KB-Zellen getestet.

## **Wirkung von Moxifloxacin**

Moxifloxacin hat von allen hier getesteten Antibiotika die höchste bakterizide Wirkung. Bei den untersuchten Bakterienstämmen kam es nach Moxifloxacingabe zu einer deutlichen Reduzierung der Keime bis hin zu deren Eliminierung.

Moxifloxacin ist in der Zahnmedizin bis jetzt noch nicht sehr gebräuchlich. Ausreichende Informationen hinsichtlich der Wirksamkeit in der Therapie parodontaler Erkrankungen liegen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor. Unsere Studie weist jedoch auf eine vergleichsweise gute antibakterielle Wirkung hin. Dabei bestehen deutliche Zusammenhänge der Wirksamkeit mit der Dauer der Einwirkzeit und der Antibiotikakonzentration. Nach 18 Stunden und höchster Dosis sind bei den *A. actinomycetemcomitans* Stämmen und *P. gingivalis* ATCC 33277 alle Keime abgetötet. Nur bei dem Patientenstamm *P. gingivalis* M5-1-2 ist keine vollständige Eliminierung erreicht worden. Dieser scheint eine geringere Empfindlichkeit gegenüber antibakteriellen Wirkstoffen zu haben. Eine sehr starke Ausprägung der Polysaccharidkapsel könnte die Ursache darstellen. Auch Eick und Pfister (2004) fanden heraus, dass die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika zwischen den Stämmen z.T. stark variieren kann.

In der Studie von Müller et al. (2002) wurde eine hohe Empfindlichkeit von *A. actinomycetemcomitans* auf das Fluorchinolon Moxifloxacin nachgewiesen. Auch *P. gingivalis* erwies sich als empfindlich gegenüber diesem Antibiotikum. Eick und Pfister (2004) konnten nach 12-stündiger Inkubation mit einer Konzentration von 100 µg/ml eine vollständige Eliminierung nachweisen.

In vitro Studien bezüglich der Wirksamkeit von Moxifloxacin auf parodontopathogene Mikroorganismen weisen positive Ergebnisse auf (Eick und Pfister 2004). Es scheint ein vielversprechender Kandidat in der adjuvanten systemischen Therapie von *A. actinomycetemcomitans* assoziierten parodontalen Erkrankungen zu sein (Müller et al. 2002).

Moxifloxacin zeigte schon nach sechs Stunden bessere antibakterielle Ergebnisse als die anderen hier untersuchten Medikamente. Es scheint sich also besonders schnell in den Zellen anzureichern, wie in der Studie von Gracia et al. (1996) beschrieben.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, dass eine vollständige Eliminierung der Bakterien bei systemischer Antibiotikaapplikation nicht zu erreichen ist. Die Wirksamkeit der Tetrazyklinpräparate auf *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* ist nur als gering, die des Metronidazols als nicht vorhanden einzuschätzen. Klinische Studien an Parodontitispatienten zeigen, dass es durch alleinige antibakterielle Therapie nicht möglich ist *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* komplett zu beseitigen (von Troil-Linden et al. 1996, Mombelli et al. 2002). Daher sollte diese in lokaler Applikation und nur als adjuvante Therapiemethode zur mechanischen Behandlung durch Scaling und Rootplaning mit einbezogen werden. Die vielversprechenden Ergebnisse mit dem Fluorchinolon Moxifloxacin sollten in klinischen Folgestudien weiter untersucht und verifiziert werden.

### **6.3 Freisetzung von MMP-3**

Der zweite Teilversuch beschäftigte sich mit der Freisetzung der Matrixmetallproteinase-3 aus Fibroblasten.

MMP-3, auch Stromelysin-1 genannt, führt zur Aufspaltung und Degradierung extrazellulärer Matrixbestandteile sowie zur Aktivierung verschiedener proMMPs. Sie sind im Rahmen der Parodontitis in erhöhten Mengen vorzufinden und unter anderem für den Abbau des Zahnhalteapparates verantwortlich. Aufgrund der Bedeutung der Anwendung von Antibiotika im Rahmen der Parodontitistherapie stellt deren modulierende Wirkung auf die Freisetzung von MMPs aus mit parodontopathogenen Keimen infizierten Fibroblasten ein interessantes Forschungsgebiet dar.

Diverse Untersuchungen haben gezeigt, dass wirtsbedingter Kollagenabbau und die Spiegel einiger MMP durch parodontale Bakterien und deren Produkte reguliert werden (Haffajee und Socransky 1994, Sorsa et al. 1992; Zhou und Windsor 2006, Chang et al. 2002, Bodet et al. 2007).

In dieser Studie wurde bereits aus nicht infizierten Fibroblasten MMP-3 freigesetzt. In dem 6-Stunden-Versuch ohne Bakterien und ohne Antibiotikazugabe waren 950 pg/ml und nach 18 Stunden 6724 pg/ml nachweisbar. In anderen Studien, wie z. B. von Domeji et al. (2002) produzierten gingivale Fibroblasten ebenfalls kontinuierlich Stromelysin-1.

Auch in gesunder Gingiva ist immer eine bestimmte Menge an MMP-3 zu finden. Sie ist notwendig für das kontinuierliche Remodelling des Gewebes. Bei der chronischen Parodontitis kommt es zum pathologischen Anstieg der aus Fibroblasten freigesetzten Enzymmenge (Beklen et al. 2006). Es ist eine erhöhte mRNA Expression von MMP-3 in gingivalen Biopsien von Parodontitis-betroffenen Geweben zu finden (Kubota et al. 1996, Ingmann et al. 1996).

Der genaue Mechanismus, der zu einer MMP-Freisetzung führt ist sehr komplex und noch nicht endgültig geklärt. TGF- $\beta$  scheint im Allgemeinen die MMP-3-Expression herunterzuregulieren (Birkendahl-Hansen 1993), wohingegen Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und EGF die Sekretionsrate dieses MMPs aus Fibroblasten erhöhen (Chang et al. 2002, Gogly 1998, Beklen et al. 2006, Domeij et al. 2002). Auch LPS und bakterielle DNA können zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern führen (Ballas et al. 1996). In der von Bodet et al. (2007) durchgeführten Studie wurde die Freisetzung von MMP-3 aus gingivalen Fibroblasten mittels *A. actinomycetemcomitans* assoziierten Lipopolysacchariden induziert. Die LPS führen zur Veränderung des Phosphorylierungszustandes und der Expression intrazellulärer Signalproteine gingivaler Fibroblasten. Es wird vermutet, dass diese Enzyme die Jun N-terminus Protein-Serin-Kinasen (JNK) und Mitogen-activated Protein-Serin-Kinase p38  $\alpha$  (p38 $\alpha$  MAPK) Signalwege induzieren. Diese führen zu einer Erhöhung der Aktivität von AP-1 (Activator Protein-1) und des Transkriptionsfaktors Nf $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ -B), welche unter anderem die Expression MMP-3 fördern können. Weiterhin kann LPS bestimmte Promoterregionen stimulieren, die dann ebenfalls zu einer erhöhten mRNA-Expression von MMP-3 führen (Rossa et al. 2007).

In unserer Studie wurde durch *A. actinomycetemcomitans* eine deutlich höhere Matrix-metallproteinasen-Freisetzung im Vergleich zu der Kontrolle ohne Bakterien provoziert. Das lässt sich durch den eben beschriebenen Mechanismus erklären.

Bei Anwesenheit von *P. gingivalis* dagegen war die nachgewiesene Enzymmenge mit ca. 400 pg/ml deutlich niedriger, als die im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien gemessenen Werte von 6700 pg/ml. In einer Studie von Zhou und Windsor (2006) wurde die Beeinflussung von *P. gingivalis* ATCC 33277 auf die Freisetzung, Aktivierung und Inhibierung von MMP-3 aus gingivalen Fibroblasten untersucht. Allerdings wurde dort die Menge der Kollagen-1-Spaltprodukte als Indikatoren für die Enzymmenge gemessen. Des

Weiteren wurde die mRNA Expression von MMP-3 ausgewertet. Die Untersuchungsergebnisse zeigten nach Infektion der Fibroblasten mit *P. gingivalis* erhöhte MMP-3-Aktivitäten aber keine Veränderung in der mRNA Menge im Vergleich zur Kontrolle.

In der vorliegenden Studie wurde allein die freie Enzymmenge nach bestimmten Inkubationszeiten gemessen. Die mRNA Werte korrelieren normalerweise mit der Menge an sezernierten Enzymen. Es wird spekuliert, dass die Herunterregulierung der MMP-3 Menge posttranslational erfolgt.

Die Vermutung, dass der Anaerobier extrazellulär MMP-3 spalten kann, wurde in diesem Versuchteil anhand der Gelelektrophorese bestätigt. Die zusätzlich auftretenden Banden unterhalb der MMP-3 Standardbanden ließen die Spaltprodukte erkennen. Es lässt sich vermuten, dass bakterieneigene Gingipaine dafür verantwortlich sind. Diese werden als Hauptverantwortliche für die proteolytische Aktivität von *P. gingivalis* betrachtet. Sie besitzen enzymatische Aktivität gegen viele Wirtsproteine wie Immunglobuline, Proteinasen und deren Inhibitoren und ebenso gegen im Komplementsystem involvierte Proteine, (Potempa et al. 2000), jedoch liegen Studien bezüglich eines Abbaus von MMP-3 bzw. anderen MMPs durch *P. gingivalis* bis dato noch nicht vor. Es ist aber bekannt, dass der Anaerobier z.B. bestimmte Interleukine hydrolysieren kann. Nach Sekretion werden diese extrazellulär gespalten und damit inaktiviert (Huang et al. 2000, Fletcher et al. 1997, Steffen et al. 2001). Die proteolytische Aktivität ist dabei allerdings von Stamm zu Stamm unterschiedlich. Ebenso kann *P. gingivalis* TIMP-1 abbauen (Zhou und Windsor 2006). Als verantwortlich wird die von dem Bakterium sezernierte Cysteinproteinase vermutet. Diese Vermutungen werden durch die Tatsache untermauert, dass es bei Zugabe eines Cysteinproteinase-Inhibitor zu keinem Verdau kommt. Auch in einer Studie von Greiner et al. (2001) konnte die Spaltung von TIMP-1 durch *P. gingivalis* festgestellt werden.

Gingipaine, die extrazellulären Cysteinproteinasen von *P. gingivalis*, stellen den Hauptvirulenzfaktor dieses parodontopathogenen Bakteriums dar. Sie werden von drei Genen kodiert, *rgpA*, *rgpB* und *kgp*. Die Arg-spezifische proteolytische Aktivität wird von *rgpA* und *rgpB* kodiert, die Lys-spezifische von *kgp*. Das heißt, dass diese Proteasen synthetische und natürliche Substrate hinter einem Arginin- bzw. Lysinrest spalten können. Gingipaine werden als große Präproproteine produziert. Der Mechanismus der Sekretion, Glykolysierung und Reifung ist noch nicht vollständig verstanden (Potempa et al. 2003). *RgpA*- und *kgp*-Gene



besitzen Sequenzen, die für Adhäsionsdomänen kodieren und bilden als Proteinase geordnete Komplexe, welche nicht-kovalent an der Zelloberfläche der Bakterien gebunden sind. Die C-terminal Domäne in den Proteinen ermöglicht das Attachment, indem es an die Domäne A1 und A3 bindet. RgpB fehlt dieses C-terminale Adhäsion-Bindungsmotiv, ist aber dennoch eine Oberflächenzellproteinase (O'Brien Simpson et al 2003). Aufgrund des weitreichenden Aktivitätsspektrums spielen die Cysteinproteinase von *P. gingivalis* eine kritische Rolle in der Pathogenese der Parodontitis, genauer gesagt in der Gewebeerstörung, Umgehung, Dysregulierung und Inaktivierung der Wirtsimmunabwehr (Greiner et al. 2003, Cutler et al. 1995).

Es ist bekannt, dass *P. gingivalis* die Produktion und Aktivierung von MMP-3 fördern kann (Zhou und Windsor 2006, DeCarlo et al. 1997; DeCarlo et al. 1998). Die Tatsache, dass der Anaerobier diese Enzyme auch zu spalten vermag zeigt, dass er eine wichtige Rolle in der Regulierung parodontaler Erkrankungen spielt. Eventuell könnten solche Mechanismen für den Übergang von akuten in chronische Phasen der Parodontitis verantwortlich sein.

Um die direkte Wirkung von Gingipainen auf MMP-3 zu bestätigen bedarf es weiterer Studien.

## **Tetracycline**

Bei den eigenen Versuchen kam es nach 18-stündiger Inkubation mit den verschiedenen Tetracyclinpräparaten ohne Mikroorganismen zu einem leichten Absinken der gemessenen MMP-3-Menge im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff. Eine geringfügige Konzentrationsabhängigkeit war bei Doxycyclin zu erkennen.

In Studien wurde festgestellt, dass Doxycyclin die Aktivität und Expression von MMPs herunterregulieren kann (Preshaw et al. , 2004). Diese Fähigkeit besitzen auch die anderen Mitglieder der Tetracyclin-Familie. Schon 1983 untersuchten Golub et al. die Wirkung von Minocyclin auf die Freisetzung von MMPs. Minocyclin verminderte die Aktivität pathologisch erhöhter Kollagenasen in der Haut diabetischer Ratten, unabhängig von der Anwesenheit pathogener Keime, um 60%. In darauf folgenden Studien wurde dieser Einfluss der Tetracycline (Tetracyclin, Doxycyclin und Minocyclin) bestätigt, wobei Nichttetracyclinpräparate keine Wirkung zeigten (Golub et al. 1984). Doxycyclin erwies sich in Untersuchungen als effektivstes unter den Antibiotika (Burns et al. 1989, Smith et al.

1999). Es besitzt die Fähigkeit von PMN produziertes HOCl zu inhibieren und verhindert damit z. B. die Aktivierung latenter proMMPs (Wasil et al. 1988, Ramamurthy et al. 1993, Ryan und Ashley 1998). Des Weiteren werden reduzierte MMP-mRNA-Synthesewerte nach Inkubation mit Tetrazyklinen beschrieben (Golub et al. 1998).

Nachgewiesen hemmt Doxycyclin die MMPs von Osteoblasten, Osteoklasten (Rifkin et al. 1994), Epithelzellen (Uitto et al. 1994), Chondrozyten (Sadowski und Steinmeyer 2001) und PMN-Typ-Kollagenasen (MMP-8). Weiterhin trägt Doxycyclin dazu bei, die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren und Zytokine herunterzuregulieren (inkl. IL-1 und TNF- $\alpha$ ) (Milano et al. 1997). Um Resistenzen zu vermeiden, wird eine subantimikrobielle Doxycyclin Dosis (SDD) (20mg 2x am Tag) vorgeschlagen. Diese Menge liegt unterhalb der MIC und zeigt keine Effekte auf Mikroorganismen (Golub et al. 1994, Golub et al. 2001). Subantibakterielle Dosen haben keinen Einfluss auf die Mikroorganismen, sondern wirken allein auf die Enzyme. Bei Kombination von SDD mit Scaling und Rootplaning kommt es zu einem deutlichen Attachmentgewinn und Verminderung der Sondierungstiefe im Gegensatz zu SRP mit einem Placebo (Preshaw et al. 2004).

In der klinischen Studie von Pourtaghi et al. (1996) führt die adjuvante, lokale Gabe von Tetrazyklin und Minocyclin in Kombination mit SRP zu einer Verminderung der MMP-3 Freisetzung.

Die Ergebnisse unserer In vitro Untersuchung zeigten bei SDD keinen Einfluss auf die Freisetzung von MMP-3. Nach Smith et al. (1999) scheint Doxycyclin beim Fibroblastentyp-MMP weniger effektiv zu sein. Höhere Konzentrationen führten zu einer verminderten Sezernierung.

Sadowski und Steinmeier (2001) fanden heraus, dass Tetrazykline (Minocyclin und Tetrazyklin) die Freisetzung von MMP-3 verringern, indem sie deren Gen-Expression in Chondrozyten herunterregulieren. Ein Tetrazyklin „responsive element“ in dem Promotor des menschlichen MMP-3 Gens scheint zu diesem Effekt zu führen (Jonat et al. 1996).

In der durchgeführten Studie stellten wir im 18-Stunden Versuch nach Infektion der Zellen mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und Tetrazyklin erhöhte MMP-3 Werte fest, wobei vor allem bei systemischer Antibiotikakonzentration der Wert auf 32667 pg/ml MMP-3 anstieg. Bei einer Dosis von 100  $\mu$ g/ml sank die Enzymmenge etwas, blieb aber dennoch über der Kontrolle ohne Antibiotikum. Der hemmende Effekt, der in anderen Studien Tetrazyklin

zugeschrieben wird, bestätigt sich bei Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* Y4 nicht. Eventuell stimuliert Tetracyclin die Freisetzung von LPS dieses Bakterienstammes. Bei dem *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384-Stamm wurden keine Antibiotika abhängigen Differenzen festgestellt.

Minocyclin und Doxycyclin führten nach 18 Stunden bei Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* zu einer deutlichen Verminderung der MMP-3 Freisetzung. Lediglich im 18-Stunden Versuch mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und systemischer Minocyclinkonzentration zeigte sich eine vermehrte Enzymfreisetzung. Minocyclin scheint bei dieser Dosis die LPS-Freisetzung zu stimulieren.

Unsere Untersuchungen ergaben bei höchster Minocyclinkonzentration und Infektion der Fibroblasten mit den *P. gingivalis* Stämmen eine vermehrte MMP-3 Freisetzung. Eventuell kann dieses Antibiotikum die Cysteinproteasen hemmen und damit die hydrolytische Aktivität von *P. gingivalis* herabsetzen. Nach der Studie von Greiner et al. (2003) scheint Minocyclin eine hemmende Wirkung auf die Proteasen dieses Bakteriums zu besitzen.

## **Metronidazol**

Unter alleiniger Einwirkung von Metronidazol mit Fibroblasten kam es zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der gemessenen MMP-3 Menge. In der klinischen Studie von Pourtaghi et al. (1996) führte die adjuvante, lokale Gabe von Metronidazol in Kombination mit SRP ebenfalls zu einer geringeren Freisetzung von MMP-3.

Metronidazol scheint keinen Einfluss auf die Freisetzung von MMP-3 durch *A. actinomycetemcomitans* zu haben. Die gemessenen MMP-3 Mengen entsprachen weitestgehend den Werten ohne Wirkstoffzugabe. Es existieren bisher noch keine Untersuchungen über die Freisetzung von MMP-3 aus gingivalen Fibroblasten bei Anwesenheit von Metronidazol. Daher ist es nicht möglich, eine Bewertung anhand von Vergleichen zu erstellen.

## **Moxifloxacin**

Moxifloxacin scheint bei längerer Einwirkdauer die MMP-3-Freisetzung aus Fibroblasten zu fördern. Diese Erhöhung könnte einen unerwünschten Nebeneffekt bei der Therapie parodontaler Erkrankungen haben. Versuche bezüglich der Wirkung von dem hier untersuchten Fluorchinolon auf MMP-3 gibt es bis dato noch nicht. Allerdings fanden Corps et al. (2002) heraus, dass Ciprofloxacin, ein weiteres Fluorchinolon, die mRNA-Expression und Freisetzung von MMP-3 aus mit IL 1- $\beta$  stimulierten menschlichen Sehnenzellen erhöht. Der genaue Mechanismus, wie Fluorchinolone Veränderungen in Zellen hervorrufen, ist noch nicht bekannt. Sie scheinen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das Aktivatorprotein-1, zu beeinflussen. In weiterführenden Versuchen wurde MMP-3 auch IL 1- $\beta$  unabhängig durch Ciprofloxacin freigesetzt (Corps et al. 2005). Weitere Studien sind notwendig, um die molekulare Ebene der Aktivierungsmechanismen dieser Antibiotikagruppe zu bestimmen.

Eine antibiotikaabhängige Verringerung der freigesetzten Enzyme war bei Infektion der Fibroblasten mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 nach 18-stündiger Inkubationszeit zu erkennen. Die Reduzierung erfolgte um das 1,9-fache. Man kann annehmen, dass eine stammspezifische Hemmung von Moxifloxacin auf die *A. actinomycetemcomitans* assoziierten LPS besteht. Dadurch werden aus den Fibroblasten weniger MMP-3 freigesetzt. Die unerwünschte Wirkung des Fluorchinolons, sprich die Erhöhung der MMP-3 Sekretion bei alleiniger Einwirkung auf Fibroblasten, scheint sich in Anwesenheit parodontopathogener Keime zu relativieren. Die bakterizide Wirkung auf die Bakterien und scheinbare Hemmung der LPS zeigen ein positives Ergebnis für dieses Antibiotikum.

Unsere Studie hat sich allein auf die Menge der MMP-3 beschränkt. Da die TIMPs, als natürliche Inhibitoren der MMPs, eine große Rolle in der Regulation der Aktivität von MMPs in gingivalen Fibroblasten spielt, sollten diese in weiterführenden Studien ebenfalls miteinbezogen werden. Interessant wäre auch der Effekt von anderen adjuvanten Medikamenten, die in der Parodontitistherapie zum Einsatz kommen, z.B. CHX auf die Freisetzung von MMP-3 aus Fibroblasten.

## 7 Schlussfolgerungen

Im Zusammenhang mit Gingivafibroblasten führen hohe Konzentrationen und lange Inkubationszeiten der Tetrazyklinpräparate Tetrazyklin, Minocyclin und Doxycyclin zu einer Reduktion von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*. Allein Moxifloxacin ist in der Lage, diese Bakterienspezies zumeist vollständig zu eliminieren. Aufnahme und Anreicherung der Wirkstoffe in den Intrazellularraum, in dem sich auch die Keime befinden, kann hierfür die Ursache sein. Metronidazol dagegen zeigt keine Wirksamkeit. Die mangelnde Effektivität auf die als sensibel getesteten *P. gingivalis* Stämme ist eventuell auf eine Veränderung der Wirkstoffeigenschaften durch die Fibroblasten zurückzuführen.

Fibroblasten sezernieren kontinuierlich MMP-3. *A. actinomycetemcomitans* führt zu einer vermehrten Freisetzung von MMP-3 aus diesen Zellen, eine ursächliche Rolle könnte das mit dem Bakterium assoziierten LPS haben. *P. gingivalis* hat Bedeutung in der Regulierung von MMP-3. Neben der möglichen Aktivierung kann der Anaerobier diese Proteinase auch spalten. Bedingt durch den proteolytischen Abbau von MMP-3 durch *P. gingivalis*, kommt es zu einem sehr starken Absinken der nachweisbaren Enzymmenge. Cysteinproteinasen könnten dafür verantwortlich sein.

Die Anwesenheit der Tetrazykline und Metronidazol führt bei Gingivafibroblasten zu einer Verminderung der MMP-3 Sezernierung, wobei vor allem hohe Wirkstoffkonzentrationen von Doxycyclin und dem Nitroimidazol wirksam sind. Bei Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* bewirkt die Zugabe von Minocyclin und Doxycyclin eine Senkung der MMP-3 Menge. Aufgrund der kollagen- und knochenabbaufördernden Eigenschaften der Proteinase ist diese Wirkungsweise der Antibiotika als positiv zu bewerten. Tetrazyklin dagegen scheint stammspezifisch die MMP-3 Freisetzung zu fördern. Minocyclin hemmt möglicherweise die proteolytische Aktivität von *P. gingivalis* und erhöht geringfügig den MMP-3-Spiegel, geringe Spiegel an MMP-3 sollten notwendig für das Knochenremodelling sein. Eventuell werden diese durch hohe Dosen Minocyclin gehemmt, bei höchster Konzentration erkennt man wieder ein Anstieg der gemessenen MMP-3 Menge. Metronidazol hat keinen Einfluss auf die *A. actinomycetemcomitans* assoziierte Enzymfreisetzung.

Inkubation mit Moxifloxacin bewirkt eine Steigerung der Enzymexpression. Dieses könnte im Rahmen einer Parodontitistherapie zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Da der antibakterielle Effekt und die damit verbundene Senkung des MMP-3-Spiegels bei Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* allerdings einen positiven Effekt darstellten, kann Moxifloxacin als Medikament in der Parodontitistherapie dennoch eine mögliche hohe Effizienz zugeschrieben werden.

Generell kann man sagen, dass Moxifloxacin zeit- und konzentrationsabhängig die besten antibakteriellen Eigenschaften besitzt, in der Regulierung der MMP-3 Freisetzung allerdings Minocyclin und Doxycyclin deutlich unterlegen ist. Der mögliche Effekt von Metronidazol scheint bei der Behandlung von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* assoziierten Parodontitisformen aus der Sicht dieser In vitro-Studie eher von untergeordneter Bedeutung.

# Literatur

- Academy Report. 2001. Guidelines for Periodontal therapy Position Paper. J Periodontol 72:1624-1628
- Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R. 2001. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. J Clin Periodontol; 28:353-359
- Amano A. 2003. Molecular interaction of Porphyromonas gingivalis with host cells: implication for microbial pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol; 74:90-96
- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 4:1-6
- Axelsson P, Lindhe J, Nyström B. 1991. On the prevention of caries and periodontal disease. J Clin Periodontol, 18:182-189
- Baehum V, Lopez R. 2003. Defining and classifying periodontitis: need for a paradigm shift?. Eur J Oral Sci; 111:2-6
- Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Konttinen Y. 2007. MMPs, IL-1 and TNF are Regulated by IL-17 in Periodontitis. J Dent Res; 86:347-351
- Beklen A, Tüter G, Sorsa T, Hanemaaijer R, Virtanen I, Tervahartiala T, Konttinen YT. 2006. Gingival tissue and cervical fluid co-operation in adult periodontitis. J Dent Res. 85:59-63
- Bramanti TE, Holt SC, Ebersole JL, Van Dyke TE. 1993. Regulation of Porphyromonas gingivalis virulence: hemin limitation effects on the outer membrane protein (OMP) expression and biological activity. J Periodontal Res. 28:464-466
- Birkedal-Hansen H. 1993. Role of Matrix-Metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol; 64:474-484
- Birkedal-Hansen H, Moore W, Bodden M, Windsor L, Birkendahl-Hansen B, DeCarlo A, Engler J. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med 4:197-250
- Bodet J, Andrain E, Tanabe SI, Grenier D. 2007. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator by human gingival fibroblasts: A potential role in connective tissue destruction. J Cell Physiol. 212:189-194
- Brayton JJ, Yang Q, Nakkula RJ, Walter JD. 2002. An in vitro model of ciprofloxacin and minocycline transport by oral epithelial cells. J Periodont; 73:1267-1272
- Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. 1999. Avalox Fachinformationen 10/99
- Burns, F. R., Stack, M. S., Gray, R. D., Paterson, C. A. 1989. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. Investigative Ophthalmology and Visual Science 30:1569-1575
- Chang YC., Yang SF., Lai JY., Hsieh YS. 2002. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. J Periodont Res. 37 :196-203

Ciancio, SG. 2002. Systemic medications: clinical significance in periodontics. J. Clin. Periodontol. 29 Suppl 2:17-21.

Corps AN, Harrall RL, Curry VA, Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. 2002. Ciprofloxacin enhances the stimulation of matrix metalloproteinase 3 expression by interleukin-1 $\beta$  in human tendon-derived cells. A potential mechanism of fluoroquinolone-induced tendinopathy. Arthritis Rheum. 46:3034-40

Corps AN, Harrall RL, Curry VA, Hazleman BL, Riley GP. 2005. Contrasting effects of fluoroquinolone antibiotics on the expression of the collagenases, matrix metalloproteinases (MMP)-1 and -13, in human tendon-derived cells Rheumatology; 44:1514–1517

Cutler C, Kalmar J, Genco C. 1995. Pathogenetic strategies of the oral anaerob Porphyromonas gingivalis. Trends Microbiol 3:45-51

DeCarlo AA, Grenett HE, Harber GJ 1998. Induction of matrix metalloproteinases and a collagen-degrading phenotype in fibroblasts and epithelial cells by secreted Porphyromonas gingivalis proteinase. J Periodont Res; 33:408–420.

DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkendahl-Hansen B, Birkendahl-Hansen H. 1997. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerob Porohyromonas gingivalis. J Dent Res 76: 1260-70

DGZMK 2003. Adjuvante Antibiotikatherapie bei Parodontitis. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK)

Domeij H, Yucel-Lindberg T, Modeer T. 2002. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. Eur J Oral Sci; 110:302-306

Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. 2000. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of Porphyromonas gingivalis. J Dent Res, 79:1808-1814

Drisko CH. 2001. Nonsurgical periodontal therapy. Periodontol 2000. 25:77-88

Eick S, Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an invitro study. J Periodontol; 75:1327-1334

Eick S, Reissmann A, Rödel J, Schmidt KH, Pfister W. 2006. Porphyromonas gingivalis survives within KB cells and modulates inflammatory response. Oral Microbiol Immunol. 21:231-237

Eick S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of Porphyromonas gingivalis with KB cells: comparison of different clinical isolates. Oral Microbiol Immunol.; 17:201-208

Eley B, Cox S. 2003. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. Periodontol 2000; 31:105–124.

Estler CJ Hrsg 1993. Pharmakologie für Zahnmediziner. 4. Auflage. Schattauer. Stuttgart. New York

Feres M, Haffajee A.D, Goncalves C, Allard K.A, Som S, Smith C, Goodson J.M, Socransky S. 1999. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. J Clin Periodontol; 26:775-783

Forth W, Henschler D, Rummel W. Hrsg 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 837-841



Genco CA. 1995. Regulation of hemin and iron transport in of *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Dent. Res* 9:41-47

Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J, Socransky S, VanDyke T. 1996. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1:926-932

Genco RJ 1996. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodonol* 67:1041-1049

Giannobile W, Lynch S, Denmark R, Paquette D, Fiorellini J, Williams R. 1995. Cervicular fluid osteocalcin and pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as markers of rapide bone turnover in periodontitis. *J Clin Periodontol*; 22:903-910

Gogley B, Hornebeck W, Groult N, Godcau G, Pellat B, 1998. Influence of heparins on the IL- $\beta$  induced expression on collagenase, stomelysine-1 and TIMP-1 in human gingival fibroblasts. *Biochem Pharmacol.*; 56:1447-1454

Golub L, Lee H, Greenwald R, Ryan M, Sorsa T, Salo T, Giannobile W 1997. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and bone-type collagenases in gingival cervicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res*; 4:310-319

Golub L, Lee H, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara T, Kaplan R, Ramamurthy N. 1983. Minocyclin reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observation and a proposed new mechanism of action. *J Period Res.* 18:516-526

Golub L, McNamara TF, Ryan M, Kohut B., Blieden T., Payonk G., Sipos T., Baron H. 2001. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 28:146–156.

Golub L, Ramamurthy N., McNamara T, Gomes B, Wolff M, Casino A, Kapoor A., Zambon J., Ciancio S. Schneir M. 1984. Tetrazyklines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research.* 19:651–655.

Gordon JM, Walker CB. 1993. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol*, 64:760

Gracia I, Pascual A.W, Conejo M.C, Perea E.J. 1996. Intracellular penetration of 5 quinolones into non-phagozytic cells. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 14:167-170

Graves DT, Al-Mashat H, Liu R. 2004. Evidence that diabetes mellitus aggravates perioodontal diseases and modifies the response to an oral pathogen in animal models. *compendium of continuing education in dentistry.* 25:38-45

Greenstein G, Lamster I. 1997. Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. *J Periodontol*, 68:421-431

Grenier D, Mayrand D. 2001. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*;25:161–164

Greiner D, Plamondon P, Sorsa T, Lee H, McNamara T, Ramamurthy N, Golub L, Teronen O, Mayrand D. 2002. Inhibition of proteolytic, serpinolytic and progelatinase-b activation of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified Tetrazyklone derivatives. *J Periodontol*; 73:79-85

Guthmiller JM., Lally ET., Korostoff J., 2001. Beyond the specific plaque hypothesis: are highly leukotoxic strains of *A. actinomycetemcomitans* a paradigm for periodontal pathogenesis? *Crit rev Oral Biol Med.*;12:116-124

Haffajee AD, Socransky SS. 2005. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology* 2000; 38:9-12

Haffajee AD, Socransky SS. 1994. Microbial ethiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 5:78-111

Hand WL, King-Thompson NL. 1990. Uptake of antibiotics by human polymorphonuclear leucocyte cytoplasts. *Antimicrob Agents Chemother*; 34:1189-1193

Hanemaaijer R, Visser H, Konttinen YT, Koolwijk P, Verheijen JH. 1998. A novel and simple immunocapture assay for determination of gelatinase-B (MMP-9) activities in biological fluids: saliva from patients with Sjögren's syndrome contain increased latent and active gelatinase-B levels. *Matrix Biol* 17:657-665

Hassell TM. 1993. Tissue and cells of the periodontium. *Periodontol* 2000; 3:9-38S

Heidemann D, Hrsg 2005. Praxis der Zahnheilkunde: Parodontologie. PdZ Reihe. 4. Auflage. München-Jena. Urban Fischer Verlag. ISBN 978-3-437-05-4907

Hellenbrecht D, Hrsg. 1998. Pharmakologie für Zahnmediziner – ein Lehrbuch der allgemeinen und speziellen Pharmakologie. Schwer, Stuttgart ISBN 3.89272-011-8

Hellwig E, Klimek J, Attin T. Hrsg 1999. Ätiologie entzündlicher Parodontopathien. Einführung in die Zahnerhaltung. München, Jena Urban und Fischer, 393-395

Hellwig H Hrsg 1989. Antibiotika-Chemotherapeutika. Grundlagen-Anwendungen-Gefahren. Ein Leitfaden für die Praxis. Thieme Verlag, Stuttgart  
Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward J 2002. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Med Microbiol.* 51: 1013-1020

Holt SC, Bramanti TE. 1991. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2:177-281

Housley T.J., Baumann AP Braun ID, Davis G, Seperak PK, Wilhelm M. 1993. Recombinant Chinese hamster ovary cell matrixmetalloprotease-3 (MMP-3, stromelysin-1). Role of calcium in promatrixmetalloprotease-3 (pro-MMP-3, prostromelysin-1) activation and thermostability of the low mass catalytic domain of MMP-3. *J. Biol. Chem.* 268 4481-4487.

Huang GT, Kim D, Lee JK, Kuramitsu, HK und Haake SK. 2000. Interleukin-8 and Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulation in Oral Epithelial Cells by Selected Periodontal Bacteria: Multiple Effects of *Porphyromonas gingivalis* via Antagonistic Mechanisms. *Infect Immun*, 69(3): 1364-1372

Imamura T, Travis J, Potempa J 2003. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Curr Protein Pept Sci*; 4:443-50

Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschersche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. 1996. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival cervicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 23:1127-1132

Jonat C, Chung FZ, Baragi VM. Transcriptional downregulation of stromelysin by tetracycline. *J Cell Biochem* 1996; 60: 341–7

Karimbux Y, Ramamurthy N., Golub L.M., Nishimura I. 1998. The expression of collagen I and XII m RNAs in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats. The Effect of doxycycline and chemically modified Tetrazykline. *J Periodontol*. 69:34-40

Kiley P, Holt S. 1980. Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect Immun*, 30:862 – 873

Klein MI, Goncalves RB. 2003. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. *J Periodontol*, 74:798-802

Knauper,V., Kramer,S., Reinke,H., Tschesche,H. 1990. Partial amino-acid sequence of human PMN leukocyte procollagenase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 371: 733

Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Hrsg 1994. 8. Auflage. *Medizinische Mikrobiologie*. München-Jena: Urban-Fischer Verlag. 376-380

Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 253–262

Lacroix JM, Mayrand D. 1989. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents on three bacterial mixtures. *Oral Microbiol Immunol* 4:82-88.

Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line: Pathogenetic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Bio Rev*. 62:1244-1263

Lamont RJ, Yilmaz. 2002. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol* 2000; 30:61-69

Lantz MS. 1996. New insights into mechanisms of bacterial pathogenesis in periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 3: 10-18

Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. 1995. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res* 30:23–33

Lemmer B, Brune K. 2004. *Pharmakotherapie - klinische Pharmakologie*. 12te Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag.

Liu L., Wen X., He H., Shi J., Ji C. 2003. Species-specific DNA probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis* from adult. Chinese periodontal patients and healthy subjects. *J Periodontol*; 74:1000-1006

Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 103–112

Loesche W, Syed S, Schmidt E, Morrison E. 1985. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol*, 56:447–456

Lopez-Piriz R, Aquilar L, Gimenez MJ. 2007. Management of odontogenic infection of pulpal and periodontal origin. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*. 1;12:E154-159

- Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G and Sandros J. 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun*, 64: 660-664
- Madinier IM, Fosse TB, Hitzig C, Charbit Y, Hannoun LR. 1999. Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *A. actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. 70:888-892
- Marsh PD. 1992. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res*; 71:1431-1438
- Matrisian LM. 1992. The matrix degrading metalloproteinases. *Bioessay* 14:455-463
- Matsushita K, Imamura T, Tomikawa M, Tancharoen S, Tatsuyama S, Maruyama I. 2006. DX-9065a inhibits proinflammatory events induced by gingipains and factor Xa. *J Periodontal Res*. 41:148-156
- McCulloch C. 1994. Collagenolytic enzymes in gingival cervical fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *Ann N Y Acad Sci*. 732:152-164
- Meyer DH, Fives-Taylor PM. 1997. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. *Trends Microbiol*; 5:224-228
- Meyer DH, Lippman JE, Fives-Taylor PM. 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun*.; 64: 2988-2997
- Milano, S., Arcoleo, F., D'Agostino, P. Cillari, E. 1997. Intraperitoneal injection of Tetrazylines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:117–121
- Mombelli A., Schmidt B., Rutar A., Lang MP. 2002 Local antibiotic therapy guided by microbiological diagnosis. Treatment of *P. gingivalis* And *A. actinomycetemcomitans* persisting after mechanical therapy. *J Clin Periodontol*;23:601-607
- Moore WE, Moore LV 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 5:66-77
- Müller HP, Holderrieth S, Burkhardt U, Höffler U. 2002. In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *J Clin Periodontol*; 29:736-742
- Murphy G Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. 1987. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J*; 248:265-268
- Nagase H, Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*; 274: 21491–21494
- Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I. 2001. Bone resorption and local interleukin 1 alpha and Interleukin 1 beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodont Res*. 36 :1-8
- Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. 1997. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun*, 65:1980-1984
- Norskov-Lauritsen N, Kilian M. 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst. Evol Microbiol*. 56:2135-46

O'Brien Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. 2003. Porphyromonas gingivalis gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. Curr Protein Pept Sci; 44:409-426

O'Conner B.C., Newman HN, Wilson M. 1990. Susceptibility and resistance of plaque bacteria to minocycline. J Periodontol. 61:228-233

Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS, Beck JD. 1998. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. Ann Periodontol 3: 233-250

Page RC. 1999. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. J Periodontal Res, 34:331-339

Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. 1997. Matrix metalloproteinases. Br J Surg; 84:160-166

Pascual A., Garcia I, Ballesta S, Perea EJ. 1999. Uptake and intracellular activity of moxifloxacin and minocyclin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother; 43:12-15

Pascale D, Gordon J, Lamster I, Mann P, Seiger M, Arndt W. 1986. Concentration of doxycycline in human gingival fluid. J Clin Periodontol, 13:841-893

Paster BJ., Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J. Bacteriol. 183:3770-3783

Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P. 2003 Activation of MMP-2 by Porphyromonas gingivalis in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 8:115-21

Pavicic MJ, van Winkelhoff AJ, Douque NH, Steures RW, deGraaf J. 1994. Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. A 2-year evaluation. J Clin Periodontol; 21:107-112

PEG. 1998. Einteilung der Fluorchinolone. Chemotherapie Journal. 7:66-68

Petit MD, Van Steenberghe TJ, Scholte LM, Van der Velden U, de Graaff J. 1993. Epidemiology and transmission of Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans among children and their family members. J Clin Periodontol, 20:641-650

Piek RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer THT, Travis J. 1996. Characterisation of the binding activities of proteinase-adhesion complexes from Porphyromonas gingivalis. J Bacteriol; 178:2876-2882

Plagmann HC. Hrsg. 1998. Lehrbuch der Parodontologie. Karl Hanser Verlag München/Wien, ISBN 3-446-17627

Potempa J, Banbula A, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. Periodontology 2000, 30:40-50

Potempa J, Pike R, Travis J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from Porphyromonas gingivalis (Gingipains) using peptidyl chloromethanes. Biol Chem; 378:223-230

Pourtaghi N, Radvar M, Mooney J, Kinane DF. 1996. The effect of subgingival antimicrobial therapy on the levels of stromelysin and tissue inhibitor metalloproteinases in gingival cervical fluid. J Periodontol; 67:866-870

- Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. 2004. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J Clin Periodontol*; 31:697-707
- Preus HR, Zambon JJ, Dunford RG, Genco RJ. 1994 The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. *J Periodontol*. 65:2-7
- Ramamurthy, N. S., Vernillo, A. T., Greenwald, R. A., Lee, H. M., Sorsa, T., Golub, L. M., Rifkin, B. R. 1993. Reactive oxygen species activate and Tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *Journal of Bone and Mineral Research* 8:1247–1253
- Rifkin, B. R., Vernillo, A. T., Golub, L. M., Ramamurthy, N. S. 1994. Modulation of bone resorption by Tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 732:165–180
- Rodrigues R, Goncalves C, Souto R, Feres.Filho E, Uzeda M, ColomboA. 2004. Antibiotic resistand profile of the subgingival microba following systemic or local Tetracycline therapy. *J Clin Periodontol*; 31:420-427
- Rossa C, Liu M, Bronson P, Kirkwood KL. 2007. Transcriptional activation of MMP-13 by periodontal pathogenic LPS requires p38 MAP kinase.*J Endotoxin Res*;13:85-93
- Ryan ME 1998 Host response in diabetes associated periodontitis: effects of Tetracycline analogues. Dissertation. State university N Y at Stony Brook
- Ryan ME, Ashley RA, 1998. How do Tetracyclines work? *Advances in Dental Research* 12:149–151
- Ryan ME, Golub LM. 2000. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontology* 2000. 24:226-238
- Ryan ME, Ramamurthy N, Golub L. 1996. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol* 3:85-96
- Ryan ME, Usamn A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA. 2001.Excessive Matrix-Metalloproteinase activity in diabetes: Inhibition by Tetracycline analogues with Zink Reactivity. *Cur Med Chem*. 8:305-316
- Sadowski T, Steinmeyer J. 2001. Effects of tetracyclines on the production of matrix metalloproteinases ans plasminogen activators as well as of their natural inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and plasminogen activator inhibitor-1. *Inflamm. Res*; 50:175-182
- Saito S, Katoh M, Masumoto S, Masuho Y. 1999. Dexamethasone inhibits collagen degradation induced by the combination of IL-1 and plasminogen in cartilage explant culture. *Biol Pharm Bull*; 22:727-730
- Sanderink R, Bengel W. 1995. Mikrobiell bedingte Destruktion im marginalen Parodont – eine Übersicht. *Parodontoloie*, 97 – 105
- Schneir M, Ramamurthy N, Golub L. 1990. Minocycline treatment of diabetic rats increases skin collagen production and mass; possible causatative mechanisms. *Matrix* 10:112-123
- Simon C, Stille W. 1997. Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. In: *Eigenschaften der Antiinfektiva*. 9te Auflage. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag.

Slots J, Jorgensen MG. 2002. Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontol.* 2000. 28:298-312

Slots J, Rams TE. 1990. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J. Clin. Periodontol.* 17:479-493

Slots J, Ting M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000, 20:82–121

Smith GNjr, Mickler EA, Hasty KA, Brandt KD. 1999. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme. *Arthritis and Rheumatism* 42:1140–1146.

Soder PO, Frithiof L, Wikner S, Wouters F, Engstrom PE, Rubin B, Nedlich U, Soder B. The effect of systemic metronidazole after nonsurgical treatment in moderate and advanced periodontitis in young adults. *J Periodontol* 1990; 61: 281–288

Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K et al.. 1992. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblasttype interstitial collagenases ; 60:4491-4495

Sorsa T, Tjaderhane L, Kontinen Y, Lauhio A, Salo T, Lee H, Golub LM, Brown DL, Mantyla P. 2006. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*; 38:306-321

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. 2004. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* ; 10 :311-318

Stanley C, Holt and Jeffrey Ebersole 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenetic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000, Vol 38:72-122

Tani Y, Tani M, Kato I. 1997. Extracellular 37kDa antigenic protein from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  and IL-6 in murine macrophages. *J Dent Res*, 76:1538-1547

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. 2006. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol* 2000; 42:180-218

Tonetti MS. 1994. Etiology and pathogenesis. In Lang, NP, Karring T. (eds.): *Proceeding of the first european workshop on periodontology*. P: 54-89, Quintessence, London

Tonetti MS. 1998. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann Periodontol*, 3:88-101

Travis J., Pike R, Imamura T, Potempa J. 1997. *P. gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodont Res*; 32:120-125

Theilade E. 1990. Factors controlling the microflora of the healthy mouth. In M.J.Hill, PD Marsh.ed.*human microbial ecology* CRC Press Inc. Boca Raton Fla, 1-65

Uitto VJ, Firth JD, Nip L, Golub LM. 1994. Doxycycline and chemically modified Tetrazyklines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 732:140–151.

Uitto V, Overall CM, McCulloch C. 2003. Proteolytic host enzymes in gingival cervix fluid. *Periodontol* 2000; 31:77-104

Van der Broek PJ. 1991. Activity of antibiotics against microorganisms ingested by mononuclear phagocytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* ; 10 :114-118

Van Steenberghe TJ, Petit MD, Scholte LH, Van der Velden U, de Graaff J. 1993. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. *J Clin Periodontol*. 20:340-345.

Van der Velden U. 2005. Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol* 2000; 39:13-21

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:5578-5582

Van Winkelhoff AJ, Slots J 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontology* 2000; 20:122-135

Van Winkelhoff AJ, Tijnhof C, de Graaff J. 1992. Microbiological and clinical results of Metronidazol plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Periodontol*, 63:52 – 57

Von Troll-Linden B, Saarela M, Matto J, Alaluusa S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. 1996. Source of suspected periodontal pathogens re-emerging after periodontal treatment. *J Clin Periodontol*; 23:601-607

Walker CB, Karpinia K, Baehni P. 2004. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontol* 2000. 36:146–165

Wakai K, Kawamura T, Umemura O, Hara Y, Machida JI. 1999. Association of medical status and physical fitness with periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 26:664-672

Wasil M., Halliwell B. Moorhouse CP. 1988. Scavenging of hypochlorous acid by Tetrazykline, ifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and Tetrazykline? *Biochemical Pharmacology*; 37:775–778

Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingiva epithelial cells. *Infect Immun*, 65:313-316

Wetmore DR, Hardman KD. 1996. Roles of the propeptide and metal ions in the folding and stability of the catalytic domain of stromelysin (matrix metalloproteinase 3). *Biochemistry* 35, 6549-6558

Yang Q, Nakkula RJ, Walters JD. 2002. Accumulation of ciprofloxacin and minicycline by cultured human gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 81:836-840

Yoshimura A, Hare Y, Kaneko T, Kato I. 1997. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*; 32:279-286

Zambon J. 1985. *Actinobacillus* in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 12:1-20

Zhou J, Windsor LJ. 2006. *P. gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodont Res* 41:47-54



Zhou J, Windsor LJ. 2007. heterogeneity in the collagen-degrading ability of *Porphyromonas gingivalis*-stimulated human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 42:77-84

## 8 Anhang

### Wirkung der Antibiotika auf die untersuchten Bakterienstämme

Tabelle 5 (zu Abb. 3)

KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und 18 Stunden mit den verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen.

	6 h				18 h			
	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2
Ohne Antibiotikum	294560	375000	1963000	1579250	503333	214000	247000	1816667
Low level ¼MKH	245258	375000	1960016	1578947	503356	214022	223979	1816657
syst. Appl.	196207	375000	1960016	1403509	391499	147601	187747	1676914
high level 100µg/ml	163506	187500	1764014	666667	195749	2731	25033	51984

Tabelle 6 (zu Abb. 4)

KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und 18 Stunden mit den verschiedenen Minocyclinkonzentrationen

	6 h				18 h			
	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2
Ohne Antibiotikum	294560	375000	1963000	1579250	503333	214000	247000	1816667
Low level ¼MKH	588813	220412	2500000	1600000	503461	127334	197628	2181818
syst. Appl.	78508	218727	2727273	800000	75519	91681	16057	636364
high level 100µg/ml	63788	155993	1134091	500000	62933	31664	1235	10545

Tabelle 7 (zu Abb. 5)

KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und 18 Stunden mit den verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen

	6 h				18 h			
	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2
Ohne Antibiotikum	294.560	375.000	1.963.000	1.579.250	503.333	214.000	247.000	1.816.667
Low level ¼MKH	478.645	297.191	2.939.735	1.801.802	503.461	156.507	185.185	2.181.818
syst. Appl.	73.638	264.045	2.939.735	653.153	94.399	88.962	129.630	1.090.909
high level 100µg/ml	66.274	221.161	1.234.689	292.793	50.346	51.565	6.296	172.727

Tabelle 8 (zu Abb. 6)

KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und 18 Stunden mit den verschiedenen Metronidazolkonzentrationen

	6 h				18 h			
	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2
Ohne Antibiotikum	294.560	375.000	1.963.000	1.579.250	503.333	214.000	247.000	1.816.667
Low level ¼ MHK	474.026	378.965	1.388.889	1.547.315	506.329	213.957	214.286	1.965.234
Syst. Applik	376.623	369.820	3.055.556	1.329.923	506.119	197.498	142.857	1.786.524
high level 100µg/ml	392.208	312.500	1.744.444	1.905.371	144.937	184.332	71.429	3.721.519

Tabelle 9 (zu Abb. 7)

KBE von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 nach 6 und 18 Stunden mit den verschiedenen Moxifloxacinkonzentrationen

	6 h				18 h			
	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2
Ohne Antibiotikum	294.560	375.000	1.963.000	1.579.250	503.333	214.000	247.000	1.816.667
Low level ¼ MHK	5.196	1.105	2.022.059	1.331.361	216	107	227.554	1.736.111
Syst. Applik	15.098	39	223.039	346.154	576	53	1.548	168.269
high level 100µg/ml	784	39	562.500	126.233	1	1	1	1.603

## Freisetzung von MMP-3 aus Fibroblasten

Tabelle 10 (zu Abb. 8)

Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach 6 und 18-stündigen Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien mit den unterschiedlichen Tetrazyklinkonzentrationen

	6 h					18 h				
	A.a. ATCC A.a.Y4 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5- 1-2		control	A.a. ATCC A.a.Y4 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5- 1-2		control
Ohne Antibiotikum	916	1545	143	345	950	14534	23809	591	372	6724
Low level ¼ MHK	2005	1532	122	681	2246	23278	21735	634	350	4974
Syst. Applik high level 100µg/ml	1360	1563	105	445	1277	32667	23363	542	375	5778
	758	1689	355	111	1409	27222	21256	566	560	5782

Tabelle 11 (zu Abb. 9)

Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach 6 und 18-stündigen Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien mit den unterschiedlichen Minocyclinkonzentrationen

	6 h					18 h				
	A.a. ATCC A.a.Y4 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5- 1-2		control	A.a. ATCC A.a.Y4 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5- 1-2		control
Ohne Antibiotikum	916	1545	143	345	950	14534	23809	591	372	6724
Low level ¼ MHK	703	811	162	338	949	7435	1555	564	385	5139
Syst. Applik high level 100µg/ml	1574	468	172	402	533	26215	2496	657	760	3653
	1124	1939	3103	1503	2217	5940	5275	1250	2350	5097

Tabelle 12 (zu Abb. 10)

Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach 6 und 18-stündigen Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien mit den unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen

	6 h					18 h				
	A.a. Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	control	A.a. Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	control
Ohne Antibiotikum	916	1545	143	345	950	14534	23809	591	372	6724
Low level ¼ MHK	1510	1357	152	303	1198	14575	16269	346	412	6752
Syst. Applik	1268	1654	132	285	1964	13503	12583	228	356	5858
high level 100µg/ml	1003	1407	180	313	1797	5832	12861	388	302	4362

Tabelle 13 (zu Abb. 11)

Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach 6 und 18-stündigen Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien mit den unterschiedlichen Metronidazolkonzentrationen

	6 h					18 h				
	A.a. Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	control	A.a. Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5-1-2	control
Ohne Antibiotikum	916	1545	143	345	950	14534	23809	591	372	6724
Low level ¼ MHK	1039	1357	170	179	638	14995	25683	346	312	5544
Syst. Applik	1114	654	158	181	1365	14755	23146	228	325	4401
high level 100µg/ml	1158	1407	349	881	2099	14937	26371	388	405	3681

Tabelle 14 (zu Abb. 12)

Freisetzung von MMP-3 (in pg/ml) aus gingivalen Fibroblasten nach 6 und 18-stündigen Kontakt mit *A. actinomycetemcomitans* (A.a.) Y4 und ATCC 33384 bzw. *P. gingivalis* (P.g.) ATCC 33277 und M5-1-2 sowie als Kontrolle (control) ohne Bakterien mit den unterschiedlichen Moxifloxacin-konzentrationen

	6 h					18 h				
	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5- 1-2	control	A.a.Y4	A.a. ATCC 33384	P. g. ATCC 33277	P.g.M5- 1-2	control
Ohne Antibiotikum	916	1545	143	345	950	14534	23809	591	372	6724
Low level ¼ MHK	941	1338	144	213	651	14779	13407	553	349	8921
Syst. Applik	879	958	146	327	1178	14445	12150	279	176	9727
high level 100µg/ml	583	1174	84	301	1436	14183	12479	346	219	9097

## **A Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. habil. S. Eick und bei Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister für die Vergabe des Promotionsthemas und die kontinuierliche und wohlwollende Betreuung meiner Arbeiten.

Weiterhin danke ich dem Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube und seinen Mitarbeitern, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften sowie für die Unterstützung bei den Vorbereitungen der Versuche. Ich danke auch Herrn F. Rost für die Herstellung der Agar-Platten und Frau C. Ranke für die Unterstützung im Labor.

Außerdem danke ich meiner Familie, im Besonderen meiner Mutter Barbara, meinem Vater Rüdiger und meinen Geschwistern Veit und Beate für den Rückhalt und die Unterstützung, die ich in den vergangenen Jahren und speziell während meines Studiums erfahren habe. Auch meinen Freunden dient ein Dank dafür, dass sie auch in schwierigen Zeiten für mich da waren.

## **B            Lebenslauf**

Name	Bettina Brungsberg
Anschrift	Mieles Heide 4 45133 Essen
Geburtstag	30.11.1980
Geburtsort	Essen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulausbildung	1987 bis 1991 Grundschule Schmachtenberg, Essen 1991 bis 2000 Theodor Heuss Gymnasium, Essen 09. bis 12. 1997 Ackworth School, Ackworth, England Erlangen des Cambridge Certificates Mai 2000 Abitur
Studium	2000 bis 2007 Studium der Zahnmedizin an der FSU Jena 07. 2006 bis 01. 2007 Staatsexamen Zahnmedizin
Promotionsstudium	02. 2007 bis 09. 2007
Assistenzzeit	seit 08. 2007 bei Dr. med. dent. Dirk Holfeld, Essen

Essen, den

Bettina Brungsberg



## **C                    Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. med habil. Sigrun Eick
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe

Essen, den

Bettina Brungsberg